

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Ingeniería en Alimentos

**Influencia de la concentración Enzimática inicial en la cinética de
desactivación térmica de Peroxidasa comercial**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería en Alimentos.

Neil Mike López Monsalve

Valdivia Chile 2003

- Profesor Patrocinante:

Elton F. Morales Blancas

Ingeniero en Industrias Alimentarias, Mg. Sc.

Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL)

- Profesor Co-Patrocinante:

Alejandro Reyes Pinto

Doctor en Ciencias

Instituto de Bioquímica

- Profesor Informante:

Marcia Costa Lobo

Ingeniero Civil Bioquímico

Instituto de Ciencias y Tecnología de los Alimentos

*A Dios, la Virgen, mis padres,
hermanos y Ana María por todo
su amor y apoyo incondicional*

Agradecimientos

A mi profesor patrocinante Sr. Elton Morales por el apoyo, guía y cooperación durante todo el desarrollo del trabajo.

A la Sra. Marcia Costa y al Sr. Alejandro Reyes por su cooperación y su tiempo.

Al Dr. Luis Cisnero Zevallos del Department of Horticultural Sciences, TEXAS A&M University por el apoyo en material y sugerencias realizadas.

Al ICYTAL por la formación entregada durante los años de estudio.

A mis compañeros de Carrera Marta Contreras y Jaime Vargas por su preocupación y amistad en todo momento.

A mis amigos José Miguel Murúa, Mauricio Ojeda y Marcelo Contreras por sus palabras de aliento en momentos difíciles.

1. INTRODUCCION

Las enzimas peroxidasa y/o lipoxigenasa son comúnmente utilizadas como indicadores del tratamiento térmico del proceso de escaldado, ya que la desactivación de estas enzimas lleva consigo un aumento de la vida útil del vegetal procesado. Diversos estudios indican que la enzima indicadora para un tratamiento térmico se debe elegir en forma individual para cada vegetal. La mayor parte de estos estudios están basados principalmente en la evaluación de la desactivación térmica de la enzima peroxidasa sometiendo el extracto enzimático o pequeños trozos de los productos al medio escaldador, ya sea agua, vapor o microondas a diversas condiciones de tiempo y temperatura.

En la literatura se dispone de investigaciones realizadas durante los últimos años, relacionados con la cinética de desactivación térmica de la peroxidasa en diversos vegetales y extractos. La mayoría de estos estudios presentan curvas de desactivación con tendencia bifásica, las cuales han sido descritas por un modelo que considera dos fracciones, una lábil y otra resistente al calor, ambas con cinéticas de desactivación de primer orden en forma independiente. Estas investigaciones reportan valores disímiles para los parámetros k (constante de velocidad de desactivación térmica) y Ea (energía de activación), atribuyendo tal diferencia al origen de la enzima y diferencias en su termoestabilidad.

Estudios adicionales muestran que la naturaleza bifásica de la cinética de desactivación térmica de la peroxidasa se ve aumentada fuertemente por la presencia de la concentración de iones de la solución buffer, las cuales interactúan con la enzima, lo que a la vez afectaría la termoestabilidad de la forma nativa y de la actividad específica del intermediario formado. De esta forma, se demostró que la molaridad del buffer afecta la

magnitud de los parámetros de desactivación térmica. Asimismo, se indica que el pH afecta los perfiles de la cinética aunque en menor grado con respecto a la concentración de buffer utilizada.

En la literatura sólo se han encontrado estudios preliminares sobre la influencia de la concentración inicial de enzima sobre la estabilidad térmica. A esto se suma que la mayoría de las publicaciones del área no informan las concentraciones iniciales de la enzima, y en los pocos casos que se especifican los rangos de concentración, estos no son muy amplios. Lo anterior hace poco factible una evaluación del efecto de la concentración enzimática sobre la cinética de desactivación térmica.

Por otro lado, generalmente los métodos experimentales de diversas publicaciones muestran un ajuste del pH, lo cual también produciría otro tipo de interacción entre el buffer y la enzima, ampliando de esta forma las diferencias entre los resultados reportados.

A partir de los antecedentes citados se podrían explicar las diferencias en la cinética y en los parámetros termocinéticos encontradas en la literatura especializada. De esta forma, la hipótesis que se plantea probar es: la concentración inicial de enzima, afecta la cinética de desactivación térmica y por ende los parámetros termocinéticos.

Para probar esta hipótesis se propone desarrollar los siguientes objetivos específicos

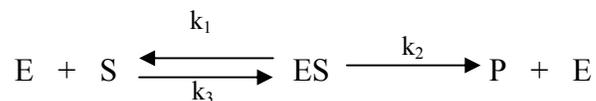
- Evaluar la cinética desactivación térmica y actividad residual de la peroxidasa comercial para un rango de temperatura de 50 a 95 °C.
- Determinar los parámetros termocinéticos que caracterizan la desactivación térmica para la enzima peroxidasa comercial a diferentes concentraciones iniciales de enzima.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Enzimas

2.1.1 Definición de las enzimas. Las enzimas son biocatalizadores complejos de gran especificidad y eficiencia, producidos por células de organismos vivos, que aumentan la velocidad de las reacciones biológicas a través de vías definidas, y cuya actividad está sujeta a regulación. Están constituidas por proteínas globulares que, a temperaturas cercanas a los 37°C, aceleran la velocidad de las reacciones químicas y biológicas por un factor de 10^{12} a 10^{20} en relación a las reacciones no catalizadas. La actividad de una enzima, se expresa en términos de la reacción que ella cataliza como la transformación de un micromol de sustrato en producto por unidad de tiempo. Mientras que las Unidades son una medida de una cantidad de enzima activa (FENNEMA, 1980).

2.1.2 Mecanismo de reacción. La actividad catalítica de las enzimas (E) actúa disminuyendo la energía de activación de ciertas reacciones, en las que el sustrato (S) se combina con la enzima formando un complejo enzima - sustrato (E - S) con mayor estabilidad que el sustrato puro. Como se observa en la siguiente reacción, una vez ocurrida la reacción y formado el producto (P), la enzima es liberada lo que permite que pueda continuar actuando, siendo muy efectivas en pequeñas cantidades (VENEGAS, 1994). Se presentan las constantes k, donde k_1 y k_3 , son las constantes de velocidad de formación y disociación, respectivamente del complejo Enzima - Sustrato (E - S) y k_2 es la constante de disociación de la Enzima y el Producto:



2.1.3 Características de las enzimas.

2.1.3.1 Especificidad. Está determinada por la capacidad de una enzima para catalizar solamente una o un reducido número de reacciones entre las posibles para un sustrato. Esta selectividad es lo que diferencia a las enzimas de los catalizadores químicos y la que define la forma de clasificación de las enzimas (Reed citado por JIMENEZ, 1993).

Existe además la especificidad de sustrato, la cual puede ser absoluta, relativa o sin especificidad, siendo más frecuente la relativa que ocurre cuando una enzima actúa en forma semejante sobre varias sustancias de composición química similar, diferenciándose en la constante de velocidad de reacción (k) (SCHMIDT-HEBBEL y PENNACCHIOTTI, 1982).

2.1.3.2 Regeneración. El fenómeno de regeneración consiste en la recuperación de actividad transcurrido un tiempo después del tratamiento térmico (HEMEDA y KLEIN, 1990). Esto ha sido explicado asumiendo que la fracción proteica de la proteína sufre una desnaturalización parcial, con pérdida de estructura terciaria, produciendo luego una reversión a su estado normal por la recombinación de grupos hidrógenos o sulfhidrúlicos (SCHMIDT - HEBBEL y PENNACCHHIOTTI, 1982).

Después de la inactivación de una enzima con calor, existe la posibilidad de la regeneración. La peroxidasa parece ser la enzima más estable al calor y presenta esta característica (Reed citado por JIMENEZ, 1993). La Peroxidasa tiene fracciones con diferente resistencia térmica, y además posee la capacidad de regenerarse, lo cual no influye en forma importante en el deterioro del producto, sino que afecta el proceso de control de escaldado (WITHAKER, 1972; GANTHAVORN *et al.*, 1991). Sin embargo,

Güyer citado por HEMEDA y KLEIN (1990) señala que bajo ciertas condiciones de tratamientos térmicos, la regeneración de la actividad peroxidásica durante el almacenamiento, puede causar desagradables efectos en color y sabor.

La regeneración de la actividad después de una inactivación parcial bajo condiciones de medio ácido es debido a la recombinación del grupo hemo con la apoenzima desplegada seguido por un plegamiento para dar la forma nativa o similar a la peroxidasa (ADAMS 1991). Burnette citado por CHANG *et al.* (1984) señala que la reactivación de la peroxidasa puede ocurrir cuando no es totalmente inactivada por calor; resultados similares fueron encontrados por CHEU y CHEN (1991). Sin embargo APARICIO - CUESTA *et al.* (1992) demuestran que aún con desactivación total de la enzima durante el escaldado, se produce regeneración durante el almacenamiento en congelación a -18°C , aún cuando esta actividad regenerada no supera el 1,23% de la actividad inicial del vegetal.

Los tratamientos H.T.S.T. no son adecuados para la completa inactivación de la peroxidasa, debido a la presencia de isoenzimas con diferentes estabilidades al calor (Ling y Lund citados por HEMEDA y KLEIN, 1990); para iguales porcentajes de inactivación, los tratamientos H.T.S.T. favorecen la regeneración (Reed citado por JIMÉNEZ, 1993). Lu y Whitaker, citados por HEMEDA y KLEIN (1990), señalan que para prevenir la regeneración de peroxidasa se requiere un largo periodo de calentamiento. Sin embargo, un tratamiento térmico severo puede perjudicar la calidad de los vegetales enlatados y congelados. Los cambios que pueden ocurrir como resultado de sobreproceso incluyen el deterioro de color y sabor y reducción del valor nutritivo por pérdidas de vitamina C, proteínas y aminoácidos.

2.1.3.3 Isoenzimas. Se trata de formas moleculares múltiples de una enzima que catalizan fundamentalmente la misma reacción pero que difieren en sus propiedades químicas, físicas, estructurales o inmunoquímicas (SCHMIDT - HEBBEL y PENNACCHIOTTI, 1982). Poseen igual especificidad de acción y de sustrato, pero presentan diferencias de estructura primaria (secuencia de aminoácidos) y sus propiedades físicas difieren con frecuencia (Reed citado por JIMENEZ, 1993).

La presencia de isoenzimas de peroxidasa puede causar problemas en el escaldado de la mayoría de los vegetales. Las isoenzimas actúan sobre el mismo sustrato pero la composición química es diferente lo que se refleja en las variadas estabilidades al calor. La cantidad relativa de isoenzimas varía de vegetal en vegetal, y aún en la misma especie puede diferir con la variedad, edad y factores ambientales (WILLIAMS *et al.*, 1986). WANG y LUH (1983) señalan que la peroxidasa en los vegetales existe en forma soluble, iónica y covalentemente enlazada. En espárragos encontraron las fracciones soluble y iónicamente enlazada que son diferentes estructuralmente pero con propiedades similares. La fracción iónicamente enlazada fue levemente más estable al calor que la fracción soluble.

2.1.3.4 Distribución de enzimas en los vegetales. Así como la actividad enzimática difiere en los vegetales, y aún en una misma especie, también la distribución de una enzima varía dentro del mismo vegetal, principalmente si existen diferencias estructurales y/o químicas en las secciones del producto, lo que implica diferencias en la velocidad de penetración de calor y en la termorresistencia de las enzimas en el vegetal. Como lo señala Winter citado por WANG y LUH (1983), la velocidad de destrucción de peroxidasa en espárragos fue fundamentalmente dependiente del tamaño de la partícula y de la velocidad de transferencia de calor.

Haard **et al.** citado por WANG y LUH (1983), JIMENEZ (1993) y CHANDIA (2000) señalan que las actividades de peroxidasa en la zona media y apical de espárragos fueron muy diferentes, así como la distribución de isoenzimas en las secciones. Resultados similares fueron encontrados por KAMPIS **et al.** (1984) quienes estudiaron la actividad peroxidásica en tallo y "florets" de brócoli, encontrando diferencias de distribución de actividad e isoenzimas en las secciones del vegetal. Del mismo modo, DONNELLY y ROBINSON (1990) encontraron mayor estabilidad térmica de peroxidasa en la piel de peras en relación a la pulpa, y observaron que las enzimas de la piel del fruto tenían capacidad de regeneración, no así en la pulpa.

2.1.4 Acción de las enzimas en los alimentos. Las enzimas aceleran la velocidad de las reacciones químicas. Estas reacciones ocurren durante el procesamiento y/o almacenamiento de alimentos. Algunas de ellas resultan en pérdida de calidad, sabor y color del alimento (SCHMIDT – HEBBEL y PENNACCHIOTTI, 1982). Estos catalizadores biológicos pueden ser responsables del deterioro de los vegetales, afectando su textura, color, aroma y valor nutritivo si no son desactivadas oportunamente. Las principales enzimas que originan estas transformaciones en los alimentos son la lipoxigenasa, peroxidasa, polifenol oxidasa, lipasas, celulasa, tiaminasa, pectinasas, clorofilasa, entre otras (MATHEIS, 1990), que canalizan las reacciones de deterioro en el interior de la célula (endógenas), afectando la calidad de los vegetales congelados. Estas enzimas difieren en su resistencia térmica, lo que implica que la velocidad de desactivación enzimática variará dependiendo del tipo de enzima, variedad del vegetal, etc.

Holman citado por BEN - AZIZ **et al.** (1970) indica que la mayoría de los cambios de calidad que tienen lugar durante el almacenamiento y procesamiento de los alimentos son debido a la acción de enzimas endógenas oxidativas, es decir, aquellas que canalizan la transferencia de electrones de una sustancia a otra a través de una serie de mecanismos en el interior de la célula. Muchas enzimas redox pueden utilizar más de un sustrato y el estudio de estas enzimas en alimentos es más complejo debido a que

algunas de ellas, especialmente la peroxidasa pueden catalizar más de un tipo de reacción. Además se debe recordar que las actividades enzimáticas son diferentemente afectadas por los cambios que pueden ocurrir durante el procesamiento, por ejemplo por cambios de pH y temperatura (DONNELLY y ROBINSON, 1990). La actividad enzimática depende del vegetal, del sustrato oxidable, del pH y temperatura a que se trabaja.

2.1.5 Enzimas indicadoras. Para comprobar la eficiencia de un proceso de escaldado, se utilizan enzimas indicadoras, que al ser desactivadas durante el tratamiento térmico demuestran que éste se ha realizado de forma eficiente. Un bioindicador entrega información que puede ser usada como una herramienta para evaluar el impacto del proceso térmico sobre los alimentos (WENG *et al.*, 1991).

Durante muchos años se utilizó la catalasa y peroxidasa como bioindicadores del proceso de escaldado, ya que su inactivación reducía la pérdida de calidad durante el almacenamiento de los vegetales congelados, especialmente la peroxidasa, ya que al ser altamente resistente al calor, una vez desactivada se asumía que todas las demás enzimas que alteran la calidad del alimento eran destruidas. Sin embargo, la utilización de la peroxidasa como enzima indicadora universal, resulta en pérdida de color, sabor, textura y valor nutritivo, además de gasto excesivo de energía y agua, ya que debido a su resistencia térmica implica un sobreprocesamiento del alimento (BARRET y THEERAKULKAIT, 1995). De lo anterior se desprende que es necesario establecer las condiciones de proceso así como la enzima indicadora a utilizar en cada vegetal con el fin de minimizar pérdidas de calidad y gasto energético por sobreprocesamiento.

MATHEIS (1990) señala que la peroxidasa es considerada habitualmente como la enzima indicadora universal en el escaldado de vegetales ya que se encuentra en todos los vegetales. El estudio de esta enzima es de especial interés ya que es considerada

como una de las más termorresistentes (BAARDSETH, 1978). Esta característica de resistencia al calor ha motivado que sea utilizada como índice de eficiencia de los procesos de escaldado de la mayoría de los vegetales. Por inactivación de la peroxidasa se puede asumir que las enzimas causantes de deterioro de calidad han sido destruidas, sin embargo, su uso como indicador resulta en pérdida innecesaria de color, sabor, textura y calidad nutritiva además de excesivo uso de agua y energía (Lim citado por BARRET y THEERAKULKAIT, 1995).

Diversos investigadores han informado que la peroxidasa puede estar involucrada en el deterioro de la calidad sensorial de los vegetales procesados, y principalmente en el desarrollo de sabores extraños. KAMPIS *et al.* (1984), le asignan responsabilidad en la biosíntesis de lignina; CHANG *et al.* (1984) señalan que esta enzima está relacionada con cambios de sabor y color debido a la oxidación de compuestos fenólicos en quinonas (en presencia de peróxido de hidrógeno), y afectaría el valor nutritivo por reacción de éstas con aminoácidos y vitamina C en los vegetales no escaldados. Walker citado por KAMPIS *et al.* (1984), reporta que sería causante de degradación de clorofila. Por el contrario, Böttcher citado por HALPIN *et al.* (1989) informan que la peroxidasa no es directamente responsable de las pérdidas de calidad de vegetales durante su almacenamientos en congelación y Lim citado por BARRET y THEERAKULKAIT (1995) indica que con excepción de la formación de lignina en espárragos, no existe evidencia que relacione la peroxidasa con el deterioro de calidad. WILLLAMS *et al.* (1986), informaron que la peroxidasa no es la enzima involucrada en el desarrollo del sabor, y que la lipoxigenasa sería causante de este defecto en los vegetales congelados. Los autores mencionados anteriormente proponen el uso de lipoxigenasa como enzima indicadora de la eficiencia del escaldado de frijoles y arvejas verdes. Esta última requiere menor tiempo de tratamiento (debido a que la lipoxigenasa es más sensible al calor que la peroxidasa) y podría contribuir a mantener la calidad nutritiva y sensorial del producto durante el almacenamiento en congelación.

2.2 Peroxidasa

Se encuentra ampliamente distribuida en plantas superiores, encontrándose en altas concentraciones en extractos de higo y rábanos (WITHAKER, 1972). La masa molecular de esta enzima en variedades de frutas y verduras oscila entre 30.000 y 54.000 Dalton (Vámos - Vigyazó citado por WANG y LUH, 1983; SIGMA, 1998). Tiene un grupo hemo como grupo prostético; el átomo de hierro forma complejos con varios compuestos; además se ha descrito que cada molécula de la enzima une dos moléculas de Ca^{+2} (SIGMA, 1998). La actividad depende del vegetal, sustrato, pH, temperatura, etc. (SCHMIDT HEBBEL y PENNACCHIOTTI, 1982).

2.2.1 Mecanismo de reacción. Es una oxidorreductasa que cataliza reacciones usando oxígeno o peróxido como aceptor de hidrógeno. BEN - AZIZ *et al.* (1970) y HEMEDA y KLEIN (1990), señalan que los mecanismos de acción de la peroxidasa están basados en la formación de un complejo enzima - donante de hidrógeno, como se observa en la siguiente reacción:



Cataliza la reacción de ciertos compuestos dadores de hidrógeno, como fenoles (guayacol, pirogalol) y aminas aromáticas (o-fenilendiamina) por medio de peróxidos (H_2O_2). El sustrato oxidable más usado es el guayacol, que es oxidado a un complejo coloreado de tetraguayacol en presencia de peróxido (WITHAKER, 1972). La velocidad de formación del color rojo ladrillo puede ser utilizada como medida de la actividad enzimática por lecturas espectrofotométricas de las absorbancias con relación al tiempo (FENNEMA, 1980).

2.2.2 Estabilidad térmica. Las diferencias en la conducta de la peroxidasa de un vegetal a otro pueden estar relacionadas con la presencia de isoenzimas que actúan diferente frente a la presencia de antioxidantes, temperatura, pH óptimo etc.. Las peroxidases de diversas fuentes presentan variadas estabilidades térmicas y son inactivadas a diferentes velocidades por calor, presumiblemente debido a heterogeneidad

estructural de las enzimas. Las múltiples formas de peroxidasa no son igualmente susceptibles a tratamientos por calor y otros (HEMEDA y KLEIN, 1990), por lo que se requiere determinar las condiciones óptimas de proceso para cada vegetal y fruta (WILLIAMS *et al.*, 1986).

Uno de los problemas de la inactivación de peroxidasa es la presencia de 1 - 10% o más de isoenzimas termoestables de peroxidasa en la mayoría de los vegetales (Delincée citado por WILLIAMS *et al.*, 1986). Por otro lado, uno de los inconvenientes de no destruir completamente la peroxidasa es que puede regenerarse bajo ciertas condiciones (Joslyn citado por WILLIAMS *et al.*, 1986).

2.2.3 Capacidad de regeneración. Algunos autores (Haard *et al.*, citado por WANG y LUH (1983); Lu y Whitaker citados por WILLIAMS *et al.*, 1986) estudiaron las condiciones en que se regenera la peroxidasa, y señalan que se produciría por una desactivación parcial de ella con el tratamiento térmico. Sin embargo, APARICIO CUESTA *et al.* (1992) demuestran que aún con desactivación total de peroxidasa por sobreprocesamiento, se produce regeneración cerca del tercer mes de almacenamiento en congelación, y que esta actividad regenerada no estaría relacionada con pérdidas de calidad del producto.

2.3 Factores que afectan la actividad enzimática

La actividad enzimática puede ser regulada controlando ciertas condiciones tales como temperatura, pH, humedad, iones y fuerza iónica, radiaciones ionizantes, fuerzas cizallantes, presión y efecto de interfase. La estabilidad de las enzimas está relacionada a la estructura enzimática y a factores microambientales (ADAMS, 1991).

2.3.1 Efecto de la concentración de sustrato. AL - OBAIDY y SIDDIQI (1981) señalan que la velocidad de reacción se incrementó cuando la concentración de sustrato aumenta hasta un determinado valor; de acuerdo con el patrón general de reacciones enzimáticas. Del mismo modo, BEN - AZIZ **et al.** (1970) indican que a bajas concentraciones de sustrato, la relación actividad lipoxigenásica/concentración de sustrato es lineal, pero a mayores concentraciones de linoleato, la curva se torna hiperbólica y la reacción se hace más lenta, llegando a un máximo para luego permanecer constante.

Wynn citado por JIMENEZ (1993) señala que para una reacción favorable, las concentraciones de la enzima y del sustrato deben estar de tal manera que menos del 1 % del sustrato sea utilizado durante la reacción.

2.3.2 Efecto de la concentración de enzima. Las reacciones enzimáticas presentes en los alimentos se producen a velocidades limitadas por la concentración de enzima; la disponibilidad de sustrato generalmente es alta por lo que no afectaría la velocidad de la reacción (TOLEDO, 1991). Esto concuerda con que la velocidad de reacción sea proporcional a la concentración de lipoxigenasa. Diferente es el caso de otras enzimas como citocromo oxidasa, que a grandes concentraciones producen inhibición de la reacción (BEN - AZIZ **et al.**, 1970).

2.3.3 Efecto de la temperatura. La mayor parte de las enzimas, en el rango de 30 – 40°C se encuentran en el óptimo de su actividad, y sobre los 45°C comienzan a desnaturalizarse. A temperaturas bajas (refrigeración y/o congelación), las enzimas

operan a velocidad muy baja, pero recuperan su actividad cuando la temperatura se acerca a su óptimo (CHANDIA, 2000).

CHANG *et al.* (1984) señala que la temperatura óptima de la peroxidasa de coliflor es de 40°C, aún cuando a 0°C presenta un 35% de actividad. Esta actividad comienza a descender a temperaturas mayores de 40°C; a 48°C sólo permanece un 50% de la actividad, y a 60°C no se presenta.

2.3.4 Efecto del tiempo de reacción. La reacción enzimática presenta diferentes velocidades; inicia con una fase de latencia de corta duración (segundos), en la que la enzima se encuentra con el sustrato, seguido por una zona de máxima velocidad de reacción durante un tiempo dependiente de factores, como la concentración de sustrato, de enzima, temperatura de la reacción; finalmente la velocidad neta de una reacción catalizada por enzimas decrece en el tiempo porque el sistema se aproxima al equilibrio químico.

2.3.5 Efecto de la humedad. En alimentos secos la actividad de las enzimas disminuye notablemente pues, a niveles muy bajos de agua libre es dificultosa la difusión de la enzima con el sustrato (JIMENEZ, 1993).

La disponibilidad de agua, medida como actividad de agua, tiene una fuerte influencia sobre la velocidad de las reacciones por enzimas, es decir, la actividad enzimática aumenta con un mayor contenido de agua libre, lo que ocurre en las reacciones hidrolíticas y no hidrolíticas (SCHMIDT - HEBBEL y PENNACCHIOTTI, 1982).

2.3.6 Efecto del pH. El pH en el cual estos biocatalizadores presentan mayor actividad se denomina pH óptimo, que generalmente se ubica en un rango 5,0 a 9,0. Esto está basado en que fuera del pH óptimo la enzima sufre una variación en la conformación de la cadena debido a una variación de la carga de la proteína anfótera (pérdida de parte de la estructura terciaria responsable de la parte activa de la enzima). Esto puede ocasionar un efecto irreversible en la actividad si la variación de pH es drástica; si el efecto es reversible puede deberse a ionizaciones parciales de los grupos ácidos y básicos del centro activo (Bruchmann citado por JIMENEZ, 1993).

La mayoría de las enzimas presentan su máxima actividad a pH entre 4,0 y 8,0; los pH extremos inactivan las enzimas por desnaturalización proteica (CHANDÍA, 2000).

CHANG *et al.* (1984) señalan que el pH óptimo de la peroxidasa es de 6,5 a 22°C y según BEN - AZIZ *et al.* (1970), la actividad máxima de lipoxigenasa se presenta a pH 9,0; a valores menores a 6,5 no detectaron actividad, debido aparentemente a precipitación proteica.

2.3.7 Efecto de la fuerza iónica. Es la abundancia de iones en la solución. Su efecto sobre la estructura y estabilidad de proteínas tiene que ver más bien con su influencia como contraiones de los grupos cargados de las proteínas, puesto que las proteínas son polielectrolitos; en otras palabras a mayor fuerza iónica, menor la carga efectiva de la proteína (SEGEL, 1976).

2.4 Cinética de desactivación térmica

Las enzimas, al ser proteínas, se desnaturalizan con tratamientos térmicos, cumpliéndose uno de los objetivos primordiales del escaldado. La desactivación de las enzimas por tratamientos térmicos se debe a una ruptura de las fuerzas que mantienen la estructura

terciaria (pocas enzimas están activas a más de 60°C y muchas de ellas ya se alteran a 40 – 50°C). La misma ecuación de Arrhenius utilizada para determinar la energía de activación de las reacciones enzimáticas se utiliza para determinar la "energía de activación de la desactivación térmica" (Reed citado por JIMENEZ, 1993). EDIRIWEERA **et al.** (1987) señalan que debido a que la energía de activación para los procesos de desactivación térmica es más alta para las enzimas, la velocidad de inactivación aumenta rápidamente al aumentar la temperatura.

A través de la cinética enzimática se pueden obtener las combinaciones tiempo temperatura para determinada desactivación enzimática. El primer elemento esencial de información es la velocidad a que tiene lugar esta desactivación de una enzima determinada a una temperatura dada, obteniéndose diversas velocidades de inactivación a diferentes temperaturas (CHANDÍA, 2000).

La desnaturación proteica tiende a seguir una cinética de primer orden. Del mismo modo, se acepta que la inactivación de las enzimas sigue, en general, una cinética también de primer orden. Pero, cuando existe en el medio más de una enzima, como es en el caso de los alimentos, pueden aparecer cinéticas más complejas (LING y LUND, 1978).

La inactivación térmica de peroxidasa comercial fue estudiada en soluciones de buffer fosfato de sodio y en agua pura a pH 7 en el rango de temperatura de 70 – 95°C. La concentración de iones fosfato de sodio afecta la termoestabilidad y el modelo cinético produciendo un efecto estabilizante. En agua, la cinética es claramente de primer orden a altas temperaturas, mientras los resultados obtenidos con buffer fosfato de sodio 0,1 M es bifásico y con un comportamiento bifásico menos pronunciado a cuando las concentraciones buffer fosfato de sodio decrecen. El pH y la concentración de enzima también afectan el perfil de inactivación, sosteniendo la conclusión que la inactivación térmica no es un proceso monomolecular con respecto a la concentración de proteína (SARAIVA **et al.**, 1996).

Los parámetros termocinéticos que caracterizan a las enzimas en los diferentes vegetales son:

a) Constante de velocidad de reacción (k). De acuerdo a los principios en procesos térmicos presentados por MERSON *et al.* (1978) para una suspensión de esporas bacterianas sometidas a un proceso de temperatura constante, cuyos conceptos son aplicables también a sistemas enzimáticos. Así la inactivación de enzimas por el calor, a temperatura constante, puede representarse por la siguiente ecuación, (CHEFTEL *et al.*, 1983):

$$\frac{-dA}{dt} = k \times A \quad (2.1)$$

donde:

A = actividad enzimática al tiempo t .

k = constante de velocidad de inactivación térmica (min^{-1} ó s^{-1})

$\frac{dA}{dt}$ = representa la variación de la actividad enzimática con el tiempo.

La desactivación térmica de la enzima es directamente proporcional a la concentración de enzima presente; por lo tanto tiene una cinética de primer orden con relación a ese número. Por integración de la ecuación (2.1) se obtiene:

$$A = A_0 e^{-kt} \quad (2.2)$$

que también se puede escribir:

$$\text{Log}\left(\frac{A}{A_0}\right) = \frac{-kt}{2,303} \quad (2.3)$$

Donde A_0 es la actividad enzimática inicial.

Si se realiza la gráfica semilogarítmica de la actividad enzimática en función del tiempo de tratamiento, su pendiente es igual a $-k / 2,303$. En ese diagrama se representa la curva llamada “de supervivencia”, ya que A es la actividad de enzima residual en el tiempo t , es decir, que ha sobrevivido al calentamiento (CHEFTEL *et al.*, 1983).

b) Energía de activación (E_a). Es la razón de las constantes de primer orden (k_L y k_R) de la inactivación térmica para las fracciones de las isoenzimas respectivas, que se relaciona con la temperatura que se rige por la ecuación de Arrhenius.

$$k = k_0 e^{(-E_a / RT)} \quad (2.4)$$

Donde: k_0 : Factor pre-exponencial.

R : Constante universal de los gases ideales.

T : Temperatura en grados absolutos.

E_a : Energía de activación.

De esta ecuación se deduce que el gráfico de $\ln(k)$ con respecto a la inversa de la temperatura absoluta da una línea recta, cuya pendiente corresponde al cociente entre la energía de activación y la constante universal de los gases. La magnitud de E_a expresa el grado de dependencia respecto a la temperatura de la reacción en cuestión (FENNEMA, 1980).

2.5 Modelo bifásico para la cinética de desactivación enzimática

Debido a la presencia de isoenzimas con diferentes estabilidades térmicas, la velocidad de desactivación de una enzima compuesta no muestra una cinética de reacción de primer orden. Debido a ello LING y LUND (1978) propusieron un método simple para analizar la cinética de desactivación térmica de un sistema enzimático compuesto por dos grupos diferenciados por su estabilidad térmica, una fracción lábil y otra resistente al tratamiento térmico.

Este método asume un modelo cinético de primer orden para la desactivación enzimática y conociendo las respectivas velocidades de desactivación de cada fracción es posible analizar los datos de destrucción térmica y estimar los parámetros de desactivación para la fracción de isoenzimas lábil y resistente al calor.

Sea E_L y E_R las concentraciones de isoenzimas lábil y resistente, respectivamente, en un tiempo t del tratamiento térmico y al tiempo cero, estas concentraciones son representadas por E_{L0} y E_{R0} . Entonces la velocidad de desactivación térmica de cada fracción de isoenzimas a una temperatura T puede ser expresada como:

$$\frac{dE}{dt} = -k_L E_L \quad \text{ó} \quad E_L = E_{L0} e^{-k_L t} \quad (2.5)$$

$$\frac{dE}{dt} = -k_R E_R \quad \text{ó} \quad E_R = E_{R0} e^{-k_R t} \quad (2.6)$$

donde, k_L y k_R corresponden a las constantes de velocidad de desactivación térmica de isoenzimas lábil y resistente al calor, respectivamente.

La cinética de la reacción enzima-sustrato está dada por:

$$\text{Calentamiento tiempo } t = 0, \left(\frac{dS}{d\xi} \right)_{t=0} = -K_L E_{L0} S - K_R E_{R0} S \quad (2.7)$$

$$\text{Calentamiento tiempo } t = t, \left(\frac{dS}{d\xi} \right)_{t=0} = -K_L E_L S - K_R E_R S \quad (2.8)$$

Donde: S = concentración de sustrato; K_L y K_R = constantes de velocidades de reacción de las isoenzimas respectivas con el sustrato; y ξ = tiempo de reacción en el análisis.

La velocidad del desarrollo de color durante la prueba enzimática está directamente medida con la velocidad de desaparición del sustrato y el porcentaje de la actividad residual de la enzima después del tratamiento térmico, está dado por la velocidad

$$\left(\frac{dS}{d\xi} \right)_{t=t} / \left(\frac{dS}{d\xi} \right)_{t=0}$$

Si el porcentaje de la actividad residual se define como:

$$\frac{\left(\frac{dS}{d\xi} \right)_{t=t}}{\left(\frac{dS}{d\xi} \right)_{t=0}} \times 100 \quad (2.9)$$

Combinando las ecuaciones (2.5), (2.6), (2.7) y (2.8), se tiene que:

$$\% \text{ actividad residual} = \frac{[K_L E_{LO} e^{-k_L t} + K_R E_{RO} e^{-k_R t}]}{[K_L E_{LO} + K_R E_{RO}]} \times 100 \quad (2.10)$$

donde t es el tiempo de tratamiento a temperatura constante: E_{LO} y E_{RO} son las concentraciones iniciales de las fracciones de isoenzimas lábil y resistente, respectivamente; k_L y k_R corresponden a las constantes de velocidad de desactivación térmica de las isoenzimas lábil y resistente al calor, respectivamente; y, K_L y K_R son las constantes de velocidad de reacción para las isoenzimas respectivas con el sustrato.

Aplicando a la ecuación (2.10) las condiciones límites para un tiempo de tratamiento térmico largo y corto se tienen las siguientes ecuaciones, respectivamente;

$$\log [\% \text{ act. residual}] = \log \left[\frac{K_R E_{RO}}{K_L E_{LO} + K_R E_{RO}} \right] \times 100 - \frac{k_R}{2.303} t \quad (2.11)$$

$$\log \left[\% \text{ act. residual} - \frac{K_R E_{RO}}{K_L E_{LO} + K_R E_{RO}} \times 100 \right] =$$

$$\log \left[\frac{K_L E_{LO}}{K_L E_{LO} + K_R E_{RO}} \right] \times 100 - \frac{k_L}{2.303} t$$

(2.12)

Las constantes k_R y k_L pueden determinarse de las pendientes de las ecuaciones (2.11) y (2.12), respectivamente.

Considerando $K_L \approx K_R$ los valores del antilogaritmo de los interceptos de las ecuaciones (2.11) y (2.12) representarían las concentraciones relativas de las fracciones de isoenzima resistente y lábil al calor, respectivamente.

Aplicando las condiciones límites para un tratamiento térmico largo y corto, los parámetros termocinéticos pueden ser determinados de la curva de desactivación térmica la cual se caracteriza por presentar tres secciones, en donde la pendiente de la porción lineal de la curva, la cual ocurre a un tiempo de calentamiento finito, está gobernado por la ecuación (2.9). Esta porción lineal tiene una pendiente igual a $-k_R / 2,303$ y al extrapolar la línea hasta el tiempo cero, el intercepto es igual a $K_R E_{RO} / [K_L E_{LO} + K_R E_{RO}]$.

Considerando que $K_L \approx K_R$, el intercepto de la curva de desactivación térmica de mayor tiempo con el eje Y, indica la fracción de isoenzimas termorresistentes al tratamiento térmico como lo muestra la FIGURA 1.

Conociendo el valor de $K_R E_{RO} / [K_L E_{LO} + K_R E_{RO}]$, la parte inicial de la curva de inactivación térmica puede ser trazada gráficamente, en donde al valor del porcentaje de la actividad residual se le sustrae la cantidad $K_R E_{RO} / [K_L E_{LO} + K_R E_{RO}]$, siendo estos

valores graficados nuevamente en una escala logarítmica (base 10) en función del tiempo de calentamiento, la pendiente que resulta de esta porción lineal es $-k_L / 2,303$ tal como se aprecia en la FIGURA 2.

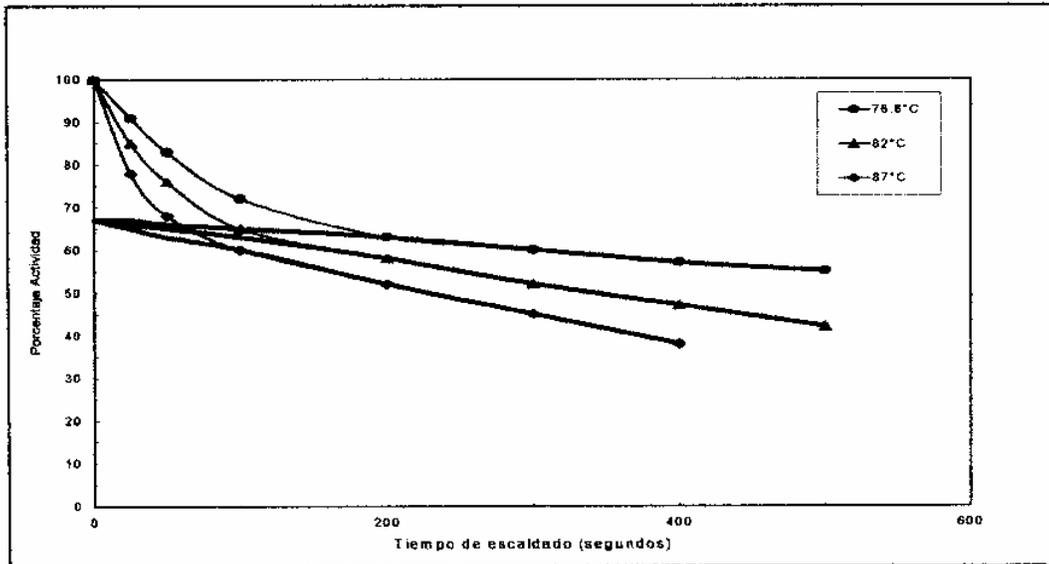


FIGURA 1. Curvas de desactivación térmica en peroxidasa de rábano.

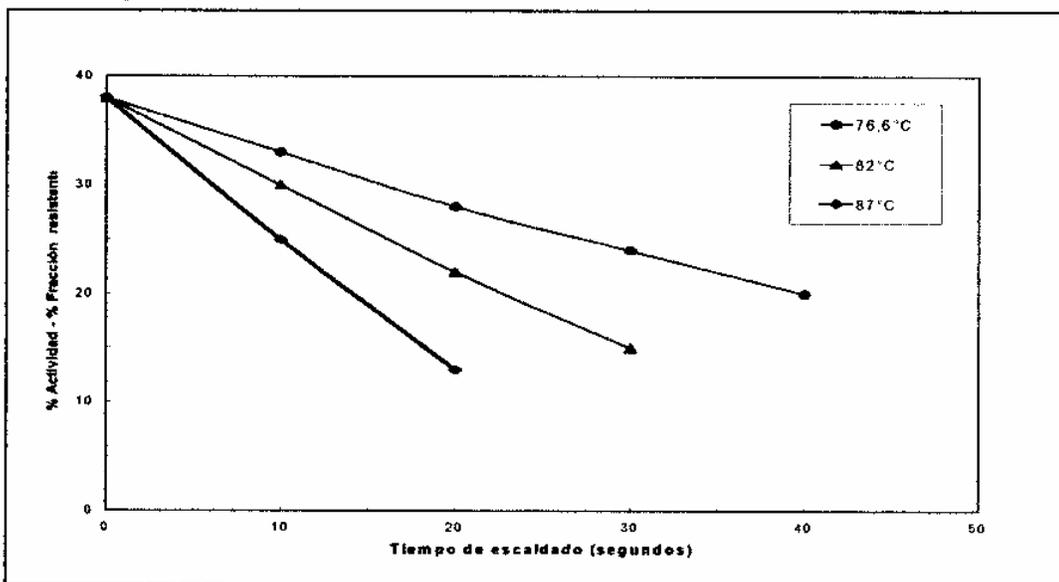


FIGURA 2. Curvas modificadas de desactivación térmica para la fracción de isoenzimas lábiles al calor.

FUENTE: LING y LUND (1978)

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Lugar y ubicación del ensayo

Los ensayos y análisis experimentales de este estudio se realizaron en los laboratorios de Procesamiento, de Química y Análisis Instrumental del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Universidad Austral de Chile.

3.2 Materia prima

La enzima comercial utilizada para el ensayo fue Peroxidasa de rábano (EC 1.11.1.7; Tipo X); obtenida de Sigma Chemical Co., (St. Louis, MO, U.S.A); conteniendo 5000 unidades en 1 mL de solución, valor RZ aproximado 3,0; 250 unidades por mg de proteína (Biuret); peso molecular 44.000; en suspensión cristalina de 3,2 M de solución $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en buffer fosfato de potasio a pH 6,0. La peroxidasa comercial utilizada contiene dos tipos de isoenzimas.

3.3 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron utilizados:

- Monofosfato de potasio (KH_2PO_4), peso molecular 136,09 (WINKLER LTDA).
- Difosfato de potasio (K_2HPO_4), peso molecular 172,01 (WINKLER LTDA).
- Guayacol (>99,5%) (MERCK)
- Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), (30%) (MERK)

3.4 Equipos e instrumentos

Los equipos e instrumentos empleados fueron los siguientes:

- Baño térmico regulable: Marca GCA/PRECISION SCIENTIFIC con termostato y termómetro digitales, Serie EC – 50: programable.

- Balanza analítica electrónica: Marca CHYO BALANCE KJ 200: precisión 0,1 mg: capacidad 200g: Japón.
- Espectrofotómetro: Marca SPECTRONIC GENESYS 5; 50/60 hertz: UV/vis.
- Termocuplas flexibles y rígidas tipo T: cobre-constantán, calibre 24 recubierto con teflón.
- Baño de hielo con sal (-10°C)
- pH-metro: Marca RADIOMETER COPENHAGEN: Modelo Type PHM 26: escala 0-14: 50/60 ciclos.
- Vortex: Marca FISHER SCIENTIFIC CO./, Modelo 58, Serie N° 115, 50/60 ciclos.
- Registrador de temperatura “DIGI-SENSE Temperatura Logger” de 12 canales.
- Cronómetro de tres canales con alarma.
- Estufa eléctrica a 80°C: Marca HORO; Serie N° 035; máximo 500 watt.
- Estufa eléctrica a 100°C; Marca GALLENKAMP; Modelo IH-150.
- Sonificador: Marca NEY, Tipo Ultrasonik.
- Computador personal EPSON PC/XT Modelo 80c 85, con Software “PCDAC 12 Analysis and Control for temperature and time Logger”.

3.5 Materiales de laboratorio

Matraces, pipetas totales y volumétricas, micropipetas, tubos de ensayo, pipetas pasteur modificadas como tubos capilares de 0,5 mm de diámetro interno, gradillas, vasos precipitados, papel aluminio, cubetas de cuarzo, frascos ambar, jeringas desechables y gas propano para sellado.

3.6 Método

3.6.1 Medición de actividad. La actividad de peroxidasa fue medida espectrofotométricamente a 470 nm usando guayacol y peróxido de hidrógeno como dador de hidrógeno y sustrato según el método descrito por HEMEDA y KLEIN (1990) con algunas modificaciones. La medición se realizó con un espectrofotómetro marca

Spectronic Genesys 5 donde se registraron los valores de absorbancia a intervalos de 10 segundos por un máximo de 30 minutos los cuales serán grabados en una tarjeta del mismo equipo y luego traspasados a un Computador Epson (PC/XT modelo 80c 85) para ser analizados mediante regresión lineal. La actividad de peroxidasa fue calculada desde la pendiente de la parte lineal de la gráfica de absorbancia versus tiempo de reacción, según método descrito por RODRIGO *et al.* (1997).

3.6.1.1 Peroxidasa (POD). Para la elaboración de estas curvas se prepararon diferentes soluciones de concentración de peroxidasa comercial a partir de una solución madre de 50 Unidad/mL que será congelada y se determinará la actividad enzimática como se describió anteriormente. Las concentraciones variaron desde 10 Unidad/mL de solución de enzima hasta 0,01 Unidad/mL de solución de enzima. Las diluciones se realizaron a partir de la solución madre previamente descongelada mezclándose con buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 6,0 y luego fueron tratadas para la medición de actividad.

La actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que produce un cambio de absorbancia de 1,0/min bajo las condiciones del ensayo, 21°C ($1U = \Delta A_{min}^{-1}$; A = absorbancia a 470 nm).

3.6.1.2 Buffer. El buffer fosfato de potasio 0,05 M y pH 6,0 se preparó realizando un balance iónico SEGEL (1976), y luego las cantidades calculadas de monofosfato y difosfato de potasio se disolvieron en agua destilada para llegar a la concentración molar y pH requerido. Este buffer será utilizado para la preparación de solución madre de enzima, diluciones y medición de actividad.

3.6.1.3 Sustrato. El sustrato para cada reacción que se realizó a las diferentes concentraciones de enzima a analizar fue preparado según HEMEDA y KLEIN (1990) con algunas modificaciones.

Se mezclaron 100 uL de guayacol (>99,5%) y 100 uL de peróxido de hidrógeno (30%)

con 99.8 mL de buffer fosfato de potasio (0,05 M; pH 6,0) aforando hasta un volumen de 100 mL dando una concentración final 8,91 mM de guayacol y 9,81 mM de peróxido de hidrógeno. La solución preparada se agito fuertemente y se dejo reposar por unos minutos.

3.6.2 Pasos operacionales para medición de actividad. Con la finalidad de entregar una mejor descripción de la metodología que se empleo para determinar la actividad de la enzima peroxidasa comercial (POD) en las diversas concentraciones que se utilizaron, se da un formato de línea de flujo la cual se muestra en la FIGURA 3.

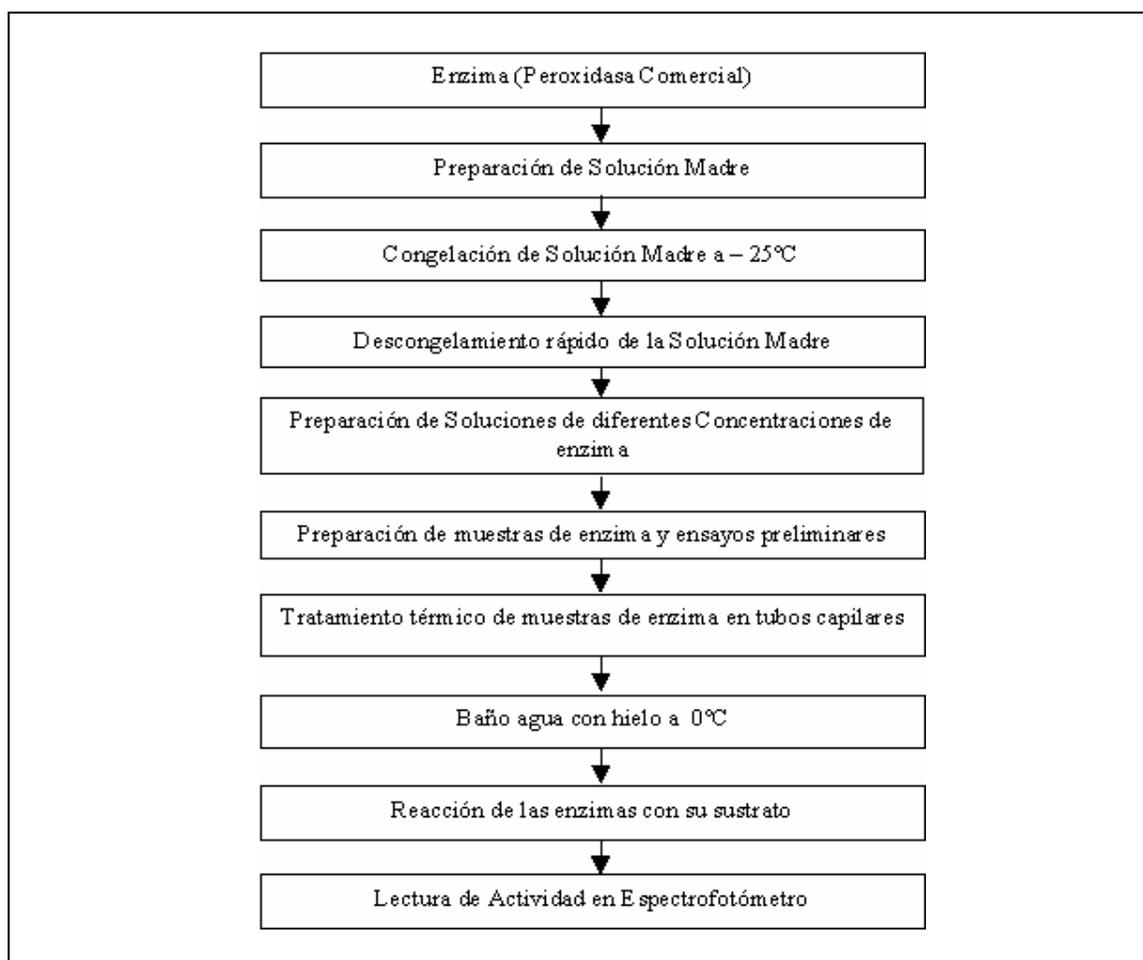


FIGURA 3. Línea de flujo para la determinación de actividad en las diferentes concentraciones de enzima peroxidasa comercial.

- a) Enzima.** En este caso solamente se utilizó la enzima comercial peroxidasa EC.1.11.1.7, de laboratorio Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.
- b) Preparación de solución Madre.** Se tomó una alícuota de 20 uL de enzima peroxidasa comercial y se diluyó con 100 mL de buffer fosfato de potasio pH 6,0. La solución resultante tendrá 1 Unidad de enzima por mL y una concentración final de 50 Unidad de enzima por mL.
- c) Congelación de la solución Madre.** Una vez preparada la solución Madre de enzima se realizó la congelación en forma rápida a -25°C , en un congelador CONSUL del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Esta congelación se realizó debido a que todas las muestras no pueden ser analizadas en un solo ensayo experimental y sus características no se ven afectadas en un grado significativo y a nivel de laboratorios es lo más empleado.
- d) Descongelamiento de la solución Madre.** Una vez que se realiza un ensayo experimental se toma la solución madre y se descongela en forma rápida hasta lograr una temperatura de 25°C .
- e) Preparación de soluciones de diferente concentración de enzima.** A partir de la solución madre se tomaron alícuotas, las cuales fueron diluidas 0, 10, 100 y 1000 veces con buffer fosfato de potasio pH 6,0; obteniéndose concentraciones de 10, 1, 0,1 y 0,01 Unidad de enzima por mL de solución resultante.
- f) Preparación de las muestras con enzima.** Para ello se tomaron 200 uL de solución de una concentración de enzima y se colocaron en tubos capilares de vidrio de 0,5 mm de diámetro interior y 15 cm de longitud, para ello se utilizó pipetas Pasteur modificadas. Una vez llenado los capilares con la enzima se sellaron sus extremos abiertos del tubo por medio de un sellador a gas propano.

- g) Ensayos preliminares.** Al comienzo de los ensayos se realizaron pruebas para hacer funcionar la metodología elegida, con la cual se puede obtener resultados preliminares de actividad y comprobación del funcionamiento del material y equipo a utilizar en las pruebas definitivas.
- h) Tratamiento de las muestras de Peroxidasa Comercial.** La enzima se colocó en capilares de vidrio de 0,5 mm de diámetro interior y se sellaron por ambos extremos para lograr condiciones cuasi-isotérmicas. Además se colocaron dentro de dos tubos capilares termocuplas flexibles y rígidas del tipo T para hacer el registro del perfil de temperatura de la muestra a tratar y del medio. Luego se sometieron a tratamiento térmico a temperaturas de 50, 60, 70, 80, y 95°C a intervalos de tiempos entre 0 – 1500 segundos, para esto se utilizó un baño térmico, con termostato y termómetro digital. La precisión de las temperaturas fue de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y los perfiles para algunas temperaturas se observan en ANEXO 1. A medida que se lleva a cabo el tratamiento térmico, se utilizó un registrador de temperatura “DIGI-SENSE” de doce canales el cual es conectado a computador Personal EPSON PC/XT para almacenar los datos obtenidos en el ensayo.
- i) Baño de agua con hielo.** Una vez terminado el tratamiento térmico de la enzima en tubos capilares, estos fueron enfriados rápidamente en un baño de agua con hielo hasta una temperatura de 0°C con la finalidad de detener lo más rápido posible la inactivación de las enzimas por efecto de la temperatura.
- j) Reacción de las enzimas con su sustrato.** Una vez que se someten las muestras al tratamiento térmico, cada enzima se hará reaccionar con su sustrato específico para producir una reacción de oxidación.
- k) Lectura de actividad en espectrofotómetro.** La detección de la reacción de oxidación de la enzima con su sustrato se determinó a través de una reacción de color la cual fue detectada en el espectrofotómetro. Para esto se mezclaron un volumen de

0,12 mL de muestra de enzima tratada con 3,62 mL de solución de sustrato en una cubeta de cuarzo con un camino óptico de 1 cm. La lectura se realizó a 21°C y a intervalos de 10 segundos de iniciada la reacción por un máximo de 30 minutos a una longitud de onda de 470 nm contra un blanco preparado con 0,12 mL de buffer fosfato 0,05 M, pH 6,0 y 3,62 mL de solución de sustrato. La actividad enzimática se expresa como variación de absorbancia por unidad de tiempo. Los datos obtenidos fueron guardados primero en una tarjeta del espectrofotómetro y luego traspasados a un computador personal EPSON PC/XT para ser analizados y obtener los resultados correspondientes a las actividades.

3.6.3 Diseño experimental. Para su evaluación se consideró un diseño experimental de tres factores concentración de enzima, tiempo y temperatura. Los rangos de tiempo evaluados fueron de 0 a 1500 segundos y los de temperatura fueron de 50 a 95°C. Se analizaron cuatro concentraciones de peroxidasa comercial: 0,01; 0,1; 1 y 10 Unidad/mL. Cada ensayo se realizó en triplicado, tal como reporta el CUADRO 1.

La actividad residual se determinó haciendo reaccionar un volumen de enzima con su sustrato. La peroxidasa es una enzima oxidoreductasa capaz de oxidar el guayacol en presencia de peróxido de hidrógeno originando un producto de color pardo-café.

En la FIGURA 4 se presentan las etapas para la evaluación de las actividades residuales para determinación de los parámetros termocinéticos de la enzima Peroxidasa comercial.

3.7 Métodos de cálculo

3.7.1 Cálculo de cinética de desactivación térmica de peroxidasa. Se procedió a través de los datos experimentales a determinar el modelo que sigue el ensayo, ya sea de tipo monofásico o bifásico. Una vez identificada la cinética se fijaron las ecuaciones correspondientes según sea el caso para determinar los parámetros termocinéticos.

CUADRO 1. Diseño experimental para la evaluación de la cinética de desactivación térmica en peroxidasa comercial.

Concentración de enzima Peroxidasa (Unidad/mL)	Temperatura del Medio (°C)	Tiempo de escaldado (segundos)	Repeticiones	N° de mediciones
10	50, 60, 70, 80, 95	0, 15, 30, 45, 60, 180, 300, 600, 1500	3	135
1	50, 60, 70, 80, 95	0, 15, 30, 45, 60, 180, 300, 600, 1500	3	135
0,1	50, 60, 70, 80, 95	0, 15, 30, 45, 60, 180, 300, 600, 1500	3	135
0,01	50, 60, 70, 80, 95	0, 15, 30, 45, 60, 180, 300, 600, 1500	3	135
N° total de experiencias				540

Nota: Todos los tratamientos consideran una etapa de hidrogenfriado hasta 0°C.

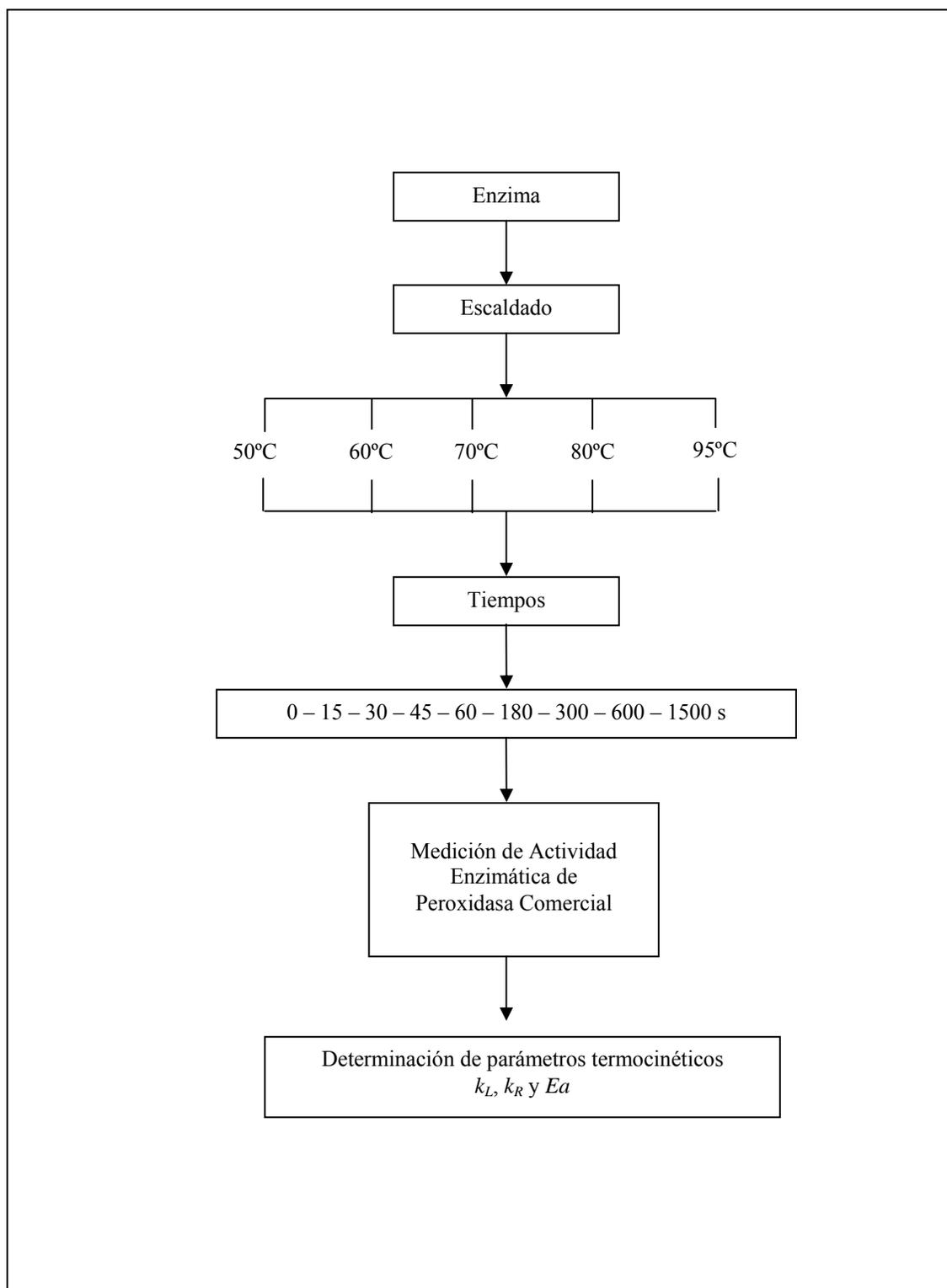


FIGURA 4. Etapas para la evaluación de las actividades residuales y determinación de los parámetros termocinéticos de la enzima peroxidasa comercial.

3.7.2 Cálculo de la actividad enzimática. En base a los valores de absorbancia determinados en diversas concentraciones de enzima y los diferentes tratamientos y tiempos, la actividad enzimática se expresó en unidades (U), donde $U = \Delta A \text{ min}^{-1}$ refiriéndose luego a un mg de proteína de la muestra tratada. Para esto se utilizó la pendiente de la gráfica obtenida de los resultados de las muestras tratadas según el método empleado por RODRIGO *et al.* (1997)

3.7.3 Relación de las constantes de velocidad de desactivación térmica (k) con la temperatura. Una vez obtenidos los valores de las constantes de velocidad de desactivación térmica de acuerdo a lo expresado en los puntos anteriores, se realizaron gráficas de $\ln(k)$ en función de la inversa de la temperatura absoluta cuya pendiente corresponde a $-Ea / R$, siendo R la constante universal de los gases ($R = 8,31 \text{ Joule / mol-g K}$).

4. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Actividad enzimática inicial para las diferentes concentraciones de peroxidasa comercial

Para este caso se analizaron muestras de las diferentes concentraciones de peroxidasa 10 Unidad/mL, 1 Unidad/mL, 0,1 Unidad/mL y 0,01 Unidad/mL en triplicado para sus diferentes tratamientos de tiempo y temperatura descritos en el diseño experimental. Los valores de la actividad residual de la enzima fueron obtenidos a través de la pendiente de la parte lineal de la gráfica de absorbancia en función del tiempo de reacción. La forma de cálculo se puede encontrar en el ANEXO 2.

Para la concentración de 0,01 Unidad/mL no se reporta valores debido a que no se detectó actividad enzimática. Para verificar lo anterior, se realizaron cinéticas de reacción de más de 2 horas para asegurar que hubiese reacción de la enzima con el sustrato. Estos resultados se pueden explicar considerando que estaba diluida 1000 veces, lo cual produce que la cantidad de enzima presente es muy pequeña para reaccionar con el sustrato. Además al haber una dilución tan alta, la molécula de peroxidasa está expuesta mayormente a cambios estructurales y de disolución química, lo que también va relacionado con la reacción que se produce con su sustrato que es del tipo de reacción acoplada (SEGEL, 1976).

Es importante mencionar que cuando la concentración aumenta influye en el equilibrio de asociación o equilibrio químico, lo que produce interacciones más fuertes en los sitios activos de la proteína que están en interfaces con sus unidades. Al ser la peroxidasa de rábano una proteína monomérica la inactivación por disolución obedece a un mecanismo a la disociación del grupo hemo o del átomo de hierro del grupo prostético de la enzima, como consecuencia de su disolución extrema. Además la

enzima comercial viene disuelta en una alta concentración con lo cual los efectos de las sales no son descartables (SHANNON et al., 1966).

Las concentraciones de enzima son reportadas en forma de Unidad/mL, donde la definición de Unidad corresponde a la formación de 1,0 mg purpurogalin desde pyrogalol en 20 s a pH 6,0 y 20°C. La unidad de purpurogalin (20 s) es equivalente aproximadamente a 18 μ M de unidad por minuto a 25°C (SIGMA, 1998). La solución enzimática comercial utilizada contiene 250 Unidad/mL,

En la literatura especializada generalmente no es reportada la concentración inicial de enzima. Esto constituye una seria dificultad, pues la cinética puede ser influenciada por la concentración inicial de la enzima (ARABSHAHI y LUND, 1985; SARAIVA et al., 1996; MORALES-BLANCAS et al., 2002). En el CUADRO 2, se presentan los resultados de la concentración inicial de enzima en (mg proteína/mL) y la actividad residual en (U_0 /mg proteína). La forma de cálculo se encuentra en ANEXO 3.

CUADRO 2. Valores de mg proteína/mL, U_0 ($\Delta A \text{ min}^{-1}$), U_0 /mL y U_0 /mg de proteína para las diferentes concentraciones de peroxidasa comercial.

Unidad/mL	10	1	0,1	0,01
mg proteína/mL	0,04	0,004	0,0004	0,00004
U_0 ($\Delta A \text{ min}^{-1}$)	$0,05101 \pm 0.001$	$0,01486 \pm 0,001$	$0,00101 \pm 0,001$	≈ 0
U_0 /mL	$0,42508 \pm 0,001$	$0,12383 \pm 0,0001$	$0,008416 \pm 0,001$	-
U_0 /mg proteína	$10,627 \pm 0,001$	$30,9583 \pm 0,001$	$21,0416 \pm 0,001$	-

Analizando el CUADRO 2, se establece que SARAIVA et al. (1996) y MORALES-BLANCAS et al. (2002) son los únicos que informan la concentración inicial de enzima peroxidasa. El primero informa la utilización de 0,4; 0,08 y 0,016 mg proteína/mL de peroxidasa comercial para el análisis de parámetros termocinéticos. El segundo obtiene valores de 0,067; 0,728; 1,054; 1,538 y 1,271 mg proteína/mL para extractos de

vegetales como brócoli, corazón de zanahoria, corteza de zanahoria, puntas de espárragos y tallos de espárragos, respectivamente. Los valores de concentraciones seleccionados (CUADRO 2), aunque fueron más bajos que los reportados por SARAIVA *et al.* (1996) y MORALES-BLANCAS *et al.* (2002), fueron establecidos mediante pruebas preliminares. Así, se determinó una concentración máxima de 10 Unidad/mL debido que a concentraciones mayores se producía una limitante que estaba dada por el equipo de medición, donde la velocidad de reacción de la enzima con el sustrato era muy rápida haciéndose difícil la medición de la cinética en los primeros 10 s. Este periodo de tiempo garantizaba una repetibilidad en la medición de las curvas de reacción.

MORALES-BLANCAS *et al.* (2002), son los únicos que informa valores de 4,888; 0,076; 0,289; 0,072 y 0,11 U₀/mg de proteína para los extractos de brocoli, corazón de zanahoria, corteza de zanahoria, puntas de espárragos y tallos de espárragos, respectivamente. Estos resultados son menores comparados con los del presente estudio, lo cual puede ser atribuible a la utilización de una enzima purificada (SEGEL, 1976).

Del presente estudio y de lo informado por MORALES-BLANCAS *et al.* (2002), se demuestra la importancia que tiene mencionar la concentración inicial de enzima (mg proteína/mL) y la actividad enzimática expresada en U₀/mg proteína. Generalmente en la literatura del área, la actividad es reportada en términos relativos [(U/U₀)x100], lo que puede traer consigo interpretaciones poco precisas de las actividades obtenidas. En el caso de la concentración 1 Unidad/mL (CUADRO 2) se reporta un valor de actividad enzimática específica (U₀/mg proteína) más alta, lo que estaría indicando que para un tipo o fuente enzimática existe una concentración adecuada que presenta la mayor actividad específica. Asimismo, del CUADRO 2 comparando las concentraciones utilizadas en el presente estudio, se puede observar que las actividades enzimáticas en U₀/mL muestran un decrecimiento de mayor a menor concentración. Sin embargo, al comparar los valores en forma de U₀/mg proteína no se observa ninguna relación entre actividad específica y la concentración. Por esta razón, sería apropiado reportar la

actividad enzimática en U_0 /mg proteína que corresponde al valor de actividad específica. Esto permitiría hacer comparaciones más directas y precisas entre los diversos estudios realizados en el área.

4.2 Cinética de desactivación térmica de la enzima peroxidasa (POD)

Los valores de actividad residual para las diferentes concentraciones de peroxidasa después del tratamiento térmico se determinaron mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Actividad Residual} = \left[\frac{U_t}{U_o} \right] \times 100$$

Para encontrar la cinética de desactivación térmica, los experimentos fueron efectuados en un intervalo de 50 a 95 °C y para un rango de 15 a 1500 s. Los valores obtenidos de actividad enzimática residual, con sus respectivas desviaciones estándar, para las concentraciones 10 Unidad/mL, 1 Unidad/mL y 0,1 Unidad/mL se presentan en ANEXO 4, 5 y 6, respectivamente. Las actividades enzimáticas relativas en porcentajes $[(U/U_0) \times 100]$ fueron graficadas en función del tiempo de calentamiento en escala semilogarítmica para cada concentración de enzima tratada (ver FIGURA 5, 6 y 7).

ARABSHAHI *et al.* (1985) mencionan que al reportar los valores en forma residual se puede provocar un error de variabilidad en la determinación de la constante (k) y cálculo de energía de activación (E_a). Con el objeto de verificar este planteamiento se realizaron gráficas semilogarítmica para el valor de actividad residual (U) en función del tiempo de tratamiento. Se comprobó que la tendencia de las curvas era la misma que para el caso de los valores residuales relativos. Esto demuestra que los cálculos de los parámetros termocinéticos se podría realizar en forma indistinta, ya sea considerando la actividad enzimática relativa o absoluta (ver ANEXO 7, 8 y 9).

La FIGURA 5, 6 y 7 muestra una drástica reducción de actividad durante los primeros 30 s para cada una de las concentraciones. A tiempos de calentamientos superiores a 60 s se producen cambios pronunciados de la pendiente y otra reducción lineal de la

actividad pero en una cantidad menor. En este caso la actividad tiende a estabilizarse; esto se observa con bastante claridad en las gráficas semilogarítmicas de actividad enzimática ($\Delta U/\text{min}$) que se encuentran en ANEXO 10. Estos resultados pueden ser descritos por el modelo bifásico de primer orden propuesto por LING y LUND (1978) basado en la presencia de 2 grupos de isoenzimas con distintas estabilidades térmicas, una fracción lábil al calor que se inactiva rápidamente y otra fracción que es termoresistente al calor que no es inactivada completamente. Este modelo bifásico es conocido también como el modelo de 2 fracciones (WENG *et al.*, 1991; SARAIVA *et al.*, 1996).

Los resultados están de acuerdo con aquellos informados por WANG y LUH (1983), POWERS *et al.* (1984), SARIKAYA y ÖZILGEN (1991), BHIRUD y SOSULSKI (1993), GÜNES y BAYINDIRH (1993), PIZZOCARO *et al.* (1993), SARAIVA *et al.* (1996), CHANDIA (2000), MORALES-BLANCAS *et al.* (2002) y otros autores que también informan un modelo bifásico para la inactivación térmica enzimática.

Analizando la FIGURA 5, 6 y 7 y los valores presentados en los ANEXO 4, 5 y 6, se observa que la concentración afecta la cinética de desactivación térmica de ambas fracciones (termolábil y termorresistente). Lo mencionado concuerda con lo descrito por ARABSHAHI y LUND (1985) y SARAIVA *et al.* (1996), donde la concentración de enzima afectaría la desactivación y por consiguiente los parámetros termocinéticos. Estas diferencias son las que se observan en diversos estudios del área explicándose por el efecto protector que la enzima manifiesta a altas concentraciones (CHANDIA, 2000; MORALES-BLANCAS *et al.*, 2002). Además, pueden influir otros factores como el pH, fuerza iónica del buffer, el sustrato a utilizar, entre otros (SARAIVA *et al.*, 1996).

4.3 Parámetros termocinéticos

En base al modelo bifásico, se establece que durante la primera etapa principalmente la fracción termolábil es inactivada, mientras que en la etapa final sólo la fracción termorresistente permanece activa. Para determinar los valores de k_L se toma un periodo

corto de calentamiento que incluye los primeros 30 s. En algunos casos, para ciertas temperaturas de tratamiento y concentración de enzima, fue necesario ampliar un poco más el rango de tiempo, llegando a tomar periodos de 45 s hasta 60 s. Para calcular k_R se utilizó tiempos de 60 s y en algunos casos de 180 s, los cuales establecían el comienzo del periodo de calentamiento. Las condiciones límites de tiempo fueron establecidas para evitar la porción de curva intermedia del modelo bifásico. Entonces, los parámetros de inactivación k_L y k_R fueron calculados desde las pendientes de la porción recta (ecuaciones 2.11 y 2.12), de las curvas consideradas para cada concentración de enzima y temperatura. Esto implica la alta disminución de la actividad enzimática durante los primeros 60 s del tratamiento térmico. Las grandes diferencias entre k_L y k_R indican que las condiciones límites utilizadas fueron las adecuadas para simplificar los análisis de los datos (ecuación 2.10).

Las constantes k_L y k_R para las fracciones lábiles y termorresistente se reportan en CUADRO 3, 4 y 5. Estas fueron determinadas a través de una regresión lineal de las porciones rectas de la curva resultante al graficar los logaritmos de las actividades residuales en función del tiempo de tratamiento térmico (ver ANEXO 11). Los resultados caen en el rango informado por LING y LUND (1978) para peroxidasa comercial con temperaturas de inactivación de 76,7 a 87,2°C, donde los intervalos van desde 183×10^{-4} a $768 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $5,75 \times 10^{-4}$ a $14 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para la fracciones termolábil y termorresistente respectivamente. De manera similar al comparar con el estudio realizado por MORALES-BLANCAS **et al.** (2002), los que trabajaron con extractos de algunos vegetales (brócolis, espárragos y zanahorias), los valores para k_L y k_R para la enzima peroxidasa y un rango de temperatura de inactivación de 70 a 95°C oscilaron desde 250×10^{-4} a $3198 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $1,25 \times 10^{-4}$ a $96,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ tanto para la fracción termolábil y termorresistente, respectivamente. También los valores de k_L y k_R en peroxidasa reportada por GÜNES y BAYINDIRH (1993) en arvejas verdes, frijoles verdes y zanahorias con temperaturas de 70 a 96°C caen en el rango de $1,7 \times 10^{-4}$ a $56,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y 50×10^{-4} a $808 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

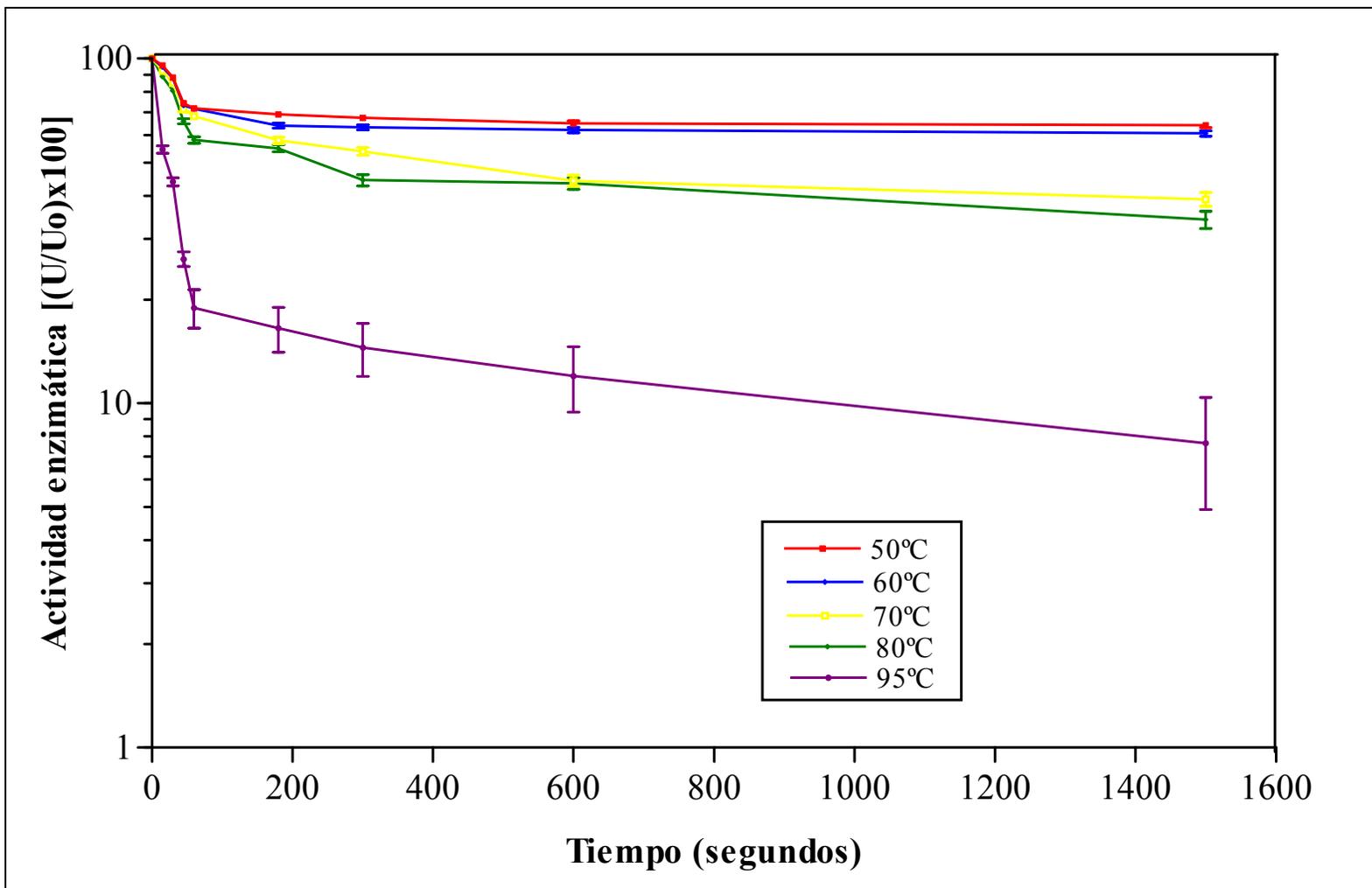


FIGURA 5. Actividades enzimáticas residuales en escala semilogarítmica de peroxidasa comercial en concentración 10 Unidad/mL para diferentes tratamientos térmicos.

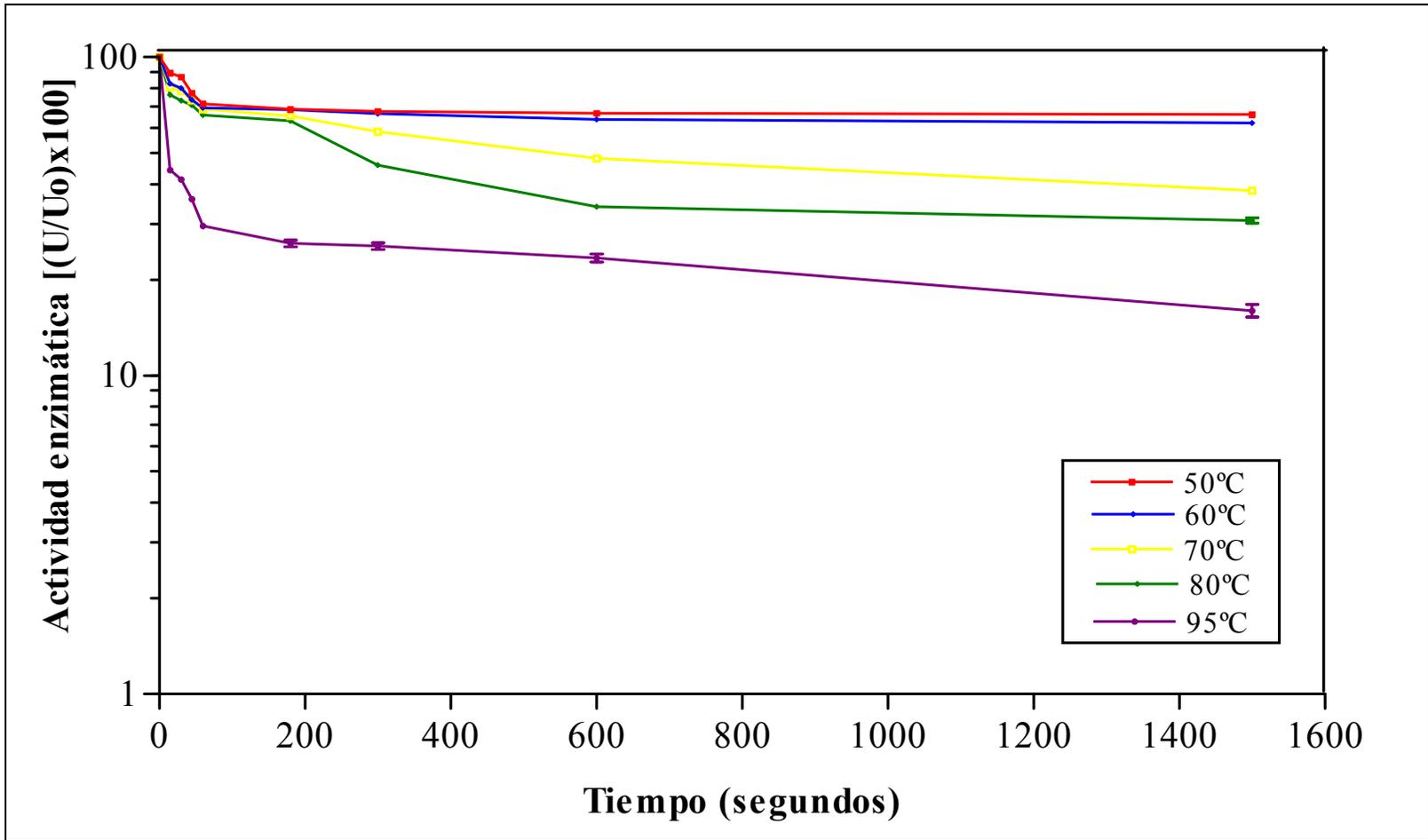


FIGURA 6. Actividades enzimáticas residuales en escala semilogarítmica de peroxidasa comercial en concentración 1 Unidad/mL para diferentes tratamientos térmicos.

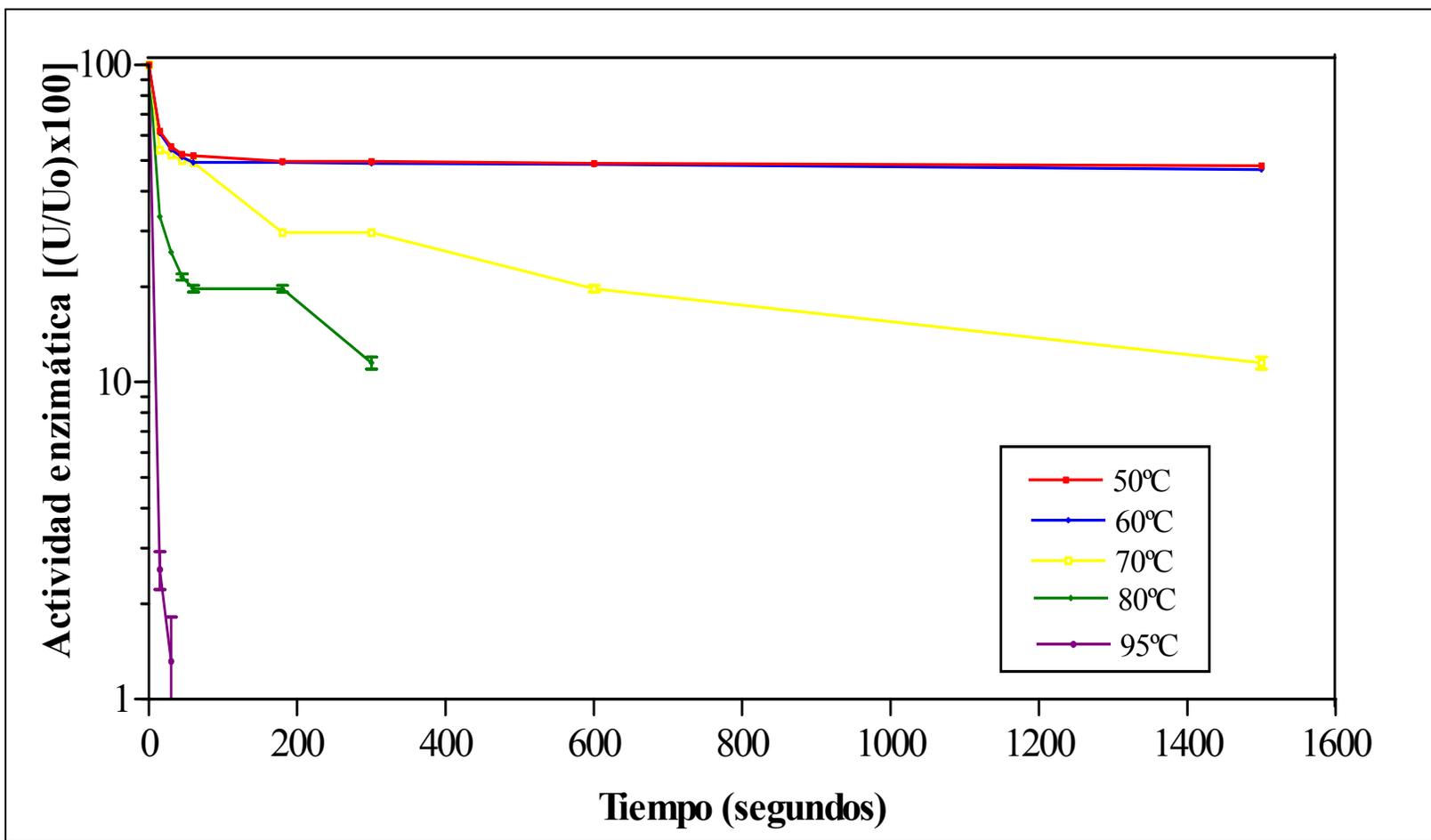


FIGURA 7. Actividades enzimáticas residuales en escala semilogarítmica de peroxidasa comercial en concentración 0,1 Unidad/mL para diferentes tratamientos térmicos.

CUADRO 3. Parámetros termocinéticos para concentración 10 Unidad/mL.

Temperatura (°C)	$\frac{E_R E_{RO}}{K_L E_{LO} + K_R E_{RO}} \times 100$	$k_R (s^{-1})$	R^2	$k_L (s^{-1})$	R^2
50	71,024	$0,833 \times 10^{-4}$	0,87	$173,3 \times 10^{-4}$	0,98
60	68,577	$1,009 \times 10^{-4}$	0,97	$179,1 \times 10^{-4}$	0,99
70	57,657	$2,788 \times 10^{-4}$	0,93	$248,5 \times 10^{-4}$	0,97
80	52,971	$3,413 \times 10^{-4}$	0,93	$363,3 \times 10^{-4}$	0,96
95	17,462	$5,602 \times 10^{-4}$	0,99	$638,1 \times 10^{-4}$	0,96

CUADRO 4. Parámetros termocinéticos para concentración 1 Unidad/mL.

Temperatura (°C)	$\frac{E_R E_{RO}}{K_L E_{LO} + K_R E_{RO}} \times 100$	$k_R (s^{-1})$	R^2	$k_L (s^{-1})$	R^2
50	68,235	$0,237 \times 10^{-4}$	0,85	$368,1 \times 10^{-4}$	0,95
60	67,934	$0,650 \times 10^{-4}$	0,90	$484,3 \times 10^{-4}$	0,97
70	65,807	$3,828 \times 10^{-4}$	0,97	$497,9 \times 10^{-4}$	0,96
80	55,501	$4,456 \times 10^{-4}$	0,86	$605,8 \times 10^{-4}$	0,99
95	28,440	$4,560 \times 10^{-4}$	0,94	$616,4 \times 10^{-4}$	0,95

CUADRO 5. Parámetros termocinéticos para concentración 0,1Unidad/mL.

Temperatura (°C)	$\frac{E_R E_{RO}}{K_L E_{LO} + K_R E_{RO}} \times 100$	$k_R (s^{-1})$	R^2	$k_L (s^{-1})$	R^2
50	49,875	$0,243 \times 10^{-4}$	0,99	$647,4 \times 10^{-4}$	0,99
60	49,27	$0,368 \times 10^{-4}$	0,99	$754,7 \times 10^{-4}$	0,99
70	34,161	$7,411 \times 10^{-4}$	0,98	$796,8 \times 10^{-4}$	0,99
80	24,652	$22,329 \times 10^{-4}$	0,86	$1425,5 \times 10^{-4}$	0,99
95	-----	0	-----	$1442,7 \times 10^{-4}$	0,93

Los valores de k_L y k_R reportados por LING y LUND (1978), GÜNES y BAYINDIRH (1993) y MORALES-BLANCAS **et al.** (2002) para enzimas de extractos vegetales y comercial concuerdan en algunos casos, pero en otros se ven diferencias más amplias a temperaturas similares de inactivación.

Los valores de k_L y k_R obtenidos en el presente trabajo para las distintas concentraciones de peroxidasa caen dentro del rango de valores informados por los autores citados. Asimismo, dichos valores de k_R y k_L varían dependiendo de la concentración, y a su vez aumentan a medida que las concentraciones se encuentren más diluidas. Además, para cada una de las concentraciones estudiadas estos valores aumentan a medida que sube la temperatura. La dependencia de la constante k con la temperatura puede ser explicada utilizando el concepto de energía de activación (ecuación 2.4).

En el CUADRO 6 se informan los valores de energía de activación (E_a) para las diferentes concentraciones, donde se observa que los valores de E_a para la fracción termorresistente son ligeramente superiores a los correspondientes a la fracción termolábil. Estos resultados concuerdan con lo informado por GÜNES y BAYINDIRH (1993), donde los valores de E_a para la fracción termorresistente es un poco más elevada que las correspondientes a la fracción termolábil. Estos autores reportan, para un rango de temperatura de 70 a 96 °C, valores de E_a entre $6,1 \times 10^4$ a $9,7 \times 10^4$ J/mol y $4,3 \times 10^4$ a $8,6 \times 10^4$ J/mol para las fracciones termorresistente y termolábil, respectivamente. Similares resultados fueron reportados por SARIKAYA y ÖZILGEN (1991), para el caso del escaldado de patatas a temperaturas entre 65 y 80 °C los valores de E_a para la fracción termorresistente y termolábil oscilaron entre $10,4 \times 10^4$ y $8,3 \times 10^4$ J/mol, respectivamente. Sin embargo, MORALES-BLANCAS **et al.** (2002) reportan valores de E_a más elevadas para la fracción termolábil que para la fracción termorresistente para un rango de temperaturas entre 70 a 95 °C. Estos valores oscilaron de $6,1 \times 10^4$ a $7,8 \times 10^4$ J/mol y de $5,5 \times 10^4$ a $6,5 \times 10^4$ J/mol, respectivamente. Estos resultados coinciden con aquellos reportados por LING y LUND (1978) y WENG **et al.** (1991) para el caso de la cinética de inactivación térmica de peroxidasa comercial. Los

primeros autores reportan valores de E_a de $14,2 \times 10^4$ J/mol para la fracción termolábil y de $8,7 \times 10^4$ para la fracción termorresistente, en el rango de temperatura de 76,6 a 87,2 °C. Los segundos informan valores para E_a de $22,6 \times 10^4$ J/mol y $9,6 \times 10^4$ J/mol para la fracción termolábil y termorresistente para un rango de temperatura entre 65 y 98 °C.

CUADRO 6. Energía de activación para las diferentes concentraciones de peroxidasa comercial de 50 a 95 °C.

Concentración Unidad/mL	Fracción termorresistente		Fracción termolábil	
	E_a (J/mol)	R^2	E_a (J/mol)	R^2
10	$4,485 \times 10^4$	0,97	$2,991 \times 10^4$	0,97
1	$6,894 \times 10^4$	0,90	$1,111 \times 10^4$	0,94
0.1	$15,651 \times 10^4$	0,96	$1,982 \times 10^4$	0,93

CUADRO 7. Energía de activación para las diferentes concentraciones de peroxidasa comercial de 70 a 95 °C.

Concentración Unidad/mL	Fracción termorresistente		Fracción termolábil	
	E_a (J/mol)	R^2	E_a (J/mol)	R^2
10	$2,971 \times 10^4$	0,98	$3,966 \times 10^4$	0,99
1	$0,698 \times 10^4$	0,91	$0,847 \times 10^4$	0,94
0,1	$11,10 \times 10^4$	0,99	$5,861 \times 10^4$	0,99

En resumen se puede establecer que los valores de E_a caen dentro del rango de los informados en las diferentes investigaciones citadas. Sin embargo, las diferencias entre los valores de E_a para las fracciones termolábil y termorresistente podrían ser explicados por las condiciones experimentales y de metodología utilizada para determinar los parámetros cinéticos. La forma de cálculo se presenta en ANEXO 12. Es posible que en los ensayos y procedimientos de ajuste y error usados por algunos investigadores puedan introducir las diferencias en cálculos de los parámetros de E_a y k (ARABSHAHY y LUND, 1985; MORALES-BLANCAS y TORRES, 2003).

Por otro lado, sobre la base de los resultados de los CUADRO 6 y 7 se pudo observar diferencias en los valores de E_a calculados al tomar diferentes rangos de temperatura. Así, al tomar rangos más amplios de temperatura por ejemplo de 50 a 95°C y luego un rango mas estrecho de 70 a 95°C, se observa un cambio en la magnitud de los valores de E_a calculados. Lo anterior puede estar produciendo las diferencias entre los valores reportados en la literatura, especialmente cuando los rangos de temperatura evaluados son diferentes. Esto podría explicarse como la introducción de un error matemático involuntario en los valores de E_a reportados en la literatura.

También, las diferencias pequeñas y grandes en los valores de los parámetros cinéticos encontrados en la literatura especializada, incluyendo los resultados del presente trabajo, pueden ser explicados por la presencia de diferentes tipos de isoenzimas en los extractos enzimáticos (VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1981; WHITAKER, 1994; CIVELLO *et al.*, 1995).

Basados en los parámetros cinéticos obtenidos por las diferentes investigaciones del área se ve una clara dependencia de 2 grupos de isoenzimas con distinto comportamiento térmico. Por lo cual el estudio depende ampliamente de la relación tiempo y temperatura, la fuente enzimática y la concentración inicial de enzima presente, que generalmente no es mencionada cuantitativamente por los investigadores (SARAIVA *et al.*, 1996; MORALES-BLANCAS *et al.*, 2002) para el cálculo de estos parámetros.

Finalmente, un aspecto importante que no ha sido totalmente abordado hasta la fecha ha sido la determinación de la actividad inicial y distribución enzimática que presentan los vegetales en estado fresco con respecto a sus estructuras y partes, las cuales pueden presentar diferencias de concentración.

Para estudios posteriores sería de gran importancia reportar los coeficientes de extinción molar (ϵ) del sustrato utilizado y principalmente la concentración inicial de enzima, lo cual permitiría hacer comparaciones mucho más precisas entre diferentes estudios de cinética de desactivación térmica de enzimas (SEGEL, 1976).

5. CONCLUSIONES

- Con respecto a la concentración inicial de enzima.
 - La concentración inicial establece que al haber una cantidad determinada de moléculas de enzima, se produciría un efecto sobre la actividad específica de las diferentes concentraciones analizadas. Obteniéndose un valor óptimo de equilibrio en su estructura monomérica y sus enlaces, lo cual produciría menos problemas de disociación química entre las moléculas.
 - Para las cuatro concentraciones de enzima peroxidasa comercial analizadas se presentaron diferencias en la actividad enzimática específica. Se obtuvo un valor de actividad específica mayor para la concentración 1 Unidad/mL. Además se observó que cuando la concentración de enzima está muy diluída (0,01 Unidad/mL) no se puede detectar su actividad.
 - Además se establece, la importancia de reportar la concentración inicial en mg proteína/mL, y la actividad específica en U_0 /mg proteína. Lo que permitiría poder realizar comparaciones mucho más cuantitativas entre la literatura especializada.

- Con respecto a la cinética de desactivación enzimática
 - Para las concentraciones 10; 1; 0,1 Unidad/mL se verificó una cinética de desactivación térmica de tipo bifásico de primer orden. Lo que indica que la enzima esta conformada por una fracción de isoenzimas lábil y otra fracción termorresistente.
 - Para todas las concentraciones se presenta una mayor desactivación de la enzima al aumentar la temperatura del tratamiento térmico.

- Con respecto a la determinación de parámetros termocinéticos
 - Los valores de la fracción termolábil (k_L) en general van aumentando a medida que disminuye la concentración. Para la fracción termorresistente se observa que para tratamientos térmicos de 50 y 60 °C, los valores de k_R son mayores a concentraciones iniciales más altas. Lo anterior demostraría el efecto protector de la enzima y de estar menos afectada la concentración de enzima para tratamientos térmicos suaves. Mientras que a temperaturas sobre 70 °C el comportamiento de k_R es similar a k_L .
 - En los valores de Energía de activación (Ea), se obtuvieron diferencias entre la fracción termolábil y termorresistente dependiendo del rango de temperatura evaluado. Esto explicaría las diferencias en los valores reportados en la literatura especializada. Lo anterior puede atribuirse a un error matemático involuntario conocido como “artifact”.

RESUMEN

En este estudio se demuestra que la concentración inicial de enzima afecta la cinética de inactivación térmica y además los parámetros termocinéticos. Se evaluaron diferentes concentraciones iniciales de 10; 1; 0,1 y 0,01 Unidad/mL de enzima peroxidasa comercial. Se utilizó el método de tubos capilares (0,5 mm de diámetro) para lograr las condiciones cuasi-isotérmicas requeridas. Se evaluó la actividad enzimática con tratamientos de 50, 60, 70, 80 y 95 °C a intervalos de tiempos comprendidos entre 0 y 1500 segundos. La actividad enzimática de peroxidasa fue determinada a través de la cinética de reacción de la gráfica de absorbancia versus tiempo de reacción y medida espectrofotométricamente a 470 nm.

De todas las concentraciones analizadas, se obtuvo un valor mayor de actividad específica para la concentración 1 Unidad/mL. Los resultados de la actividad enzimática mostraron para las diferentes concentraciones, curvas bifásicas estableciendo dos fracciones de isoenzimas, una lábil y otra termorresistente al calor. Ambas fracciones siguieron una cinética de primer orden. Los valores de la fracción termolábil (k_L) aumentaron a medida que disminuyó la concentración. De lo contrario, para concentraciones más altas, los valores de la fracción termorresistente (k_R) aumentaron a temperaturas de 50 y 60 °C solamente. Así mismo, se establecieron diferencias en los cálculos de Energía de activación tanto para la fracción termolábil como para la termorresistente.

Por lo expuesto anteriormente, es de importancia indicar la concentración inicial de enzima, la que causaría un efecto sobre la actividad enzimática, la cinética de desactivación y los parámetros termocinéticos.

SUMMARY

In this research it is showed that enzyme concentration affects thermal inactivation kinetics and therefore thermal kinetic parameters. Commercial horseradish peroxidase was evaluated for concentrations of 10, 1, 0,1, and 0,01 Unit/mL. The capillary tube method was used (0,5 mm diameter) to achieve required quasi-isothermal conditions. The enzymatic activity was evaluated at 50, 60, 70, 80 and 95 °C for heating times ranging from 0 to 1500 s. Peroxidase enzymatic activity was determined through the reaction kinetic by plotting absorbance versus reaction time, and it was spectrophotometrically measured at 470 nm.

From all of analyzed concentrations, a higher specific enzyme activity value was obtained for the concentration of 1 Unit/mL. The enzymatic activity results showed biphasic curves establishing two isoenzymes fractions, one labile and another heat-resistant. Both fractions showed a first order kinetics. The heat-labile fraction (k_L) values increased as concentration decreased. On the contrary, for higher concentrations the heat-resistant fraction (k_R) values increased at 50 and 60 °C only. Rate constants were temperature dependant, and they were fitted by Arrhenius model. Also, some differences were established in the Activation Energy (E_a) calculations for both the heat-labile and heat-resistant fractions.

As was explained above, it is extremely important to indicate the enzyme initial concentration which would cause an effect over the enzymatic activity, the inactivation kinetics, and thermal kinetics parameters.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, JB. 1991. Review: Enzyme inactivation during heat processing of food – stuffs. *International Journal of Food Science and Tecnology*. 26(1): 1-20 p.
- AL – OBAIDY, H y SIDDIQI, A. 1981. Properties of Broad Bean lipoxigenase. *Journal Food Science*. 46 (2): 622-629 p.
- APARICIO–CUESTA M., MATEOS–NOTARIO M. y RIVAS–GONZALO J. 1992. Sensory evaluations and changes in peroxidase activity during storage of frozen green beans. *Journal of Food Science*. 57(5): 1129-1131p.
- ARABSHAHI, A y LUND, D. 1985. Considerations in Calculating Kinetic Parameters from Experimental Data. *Journal Food processing Engineering*. 7(4): 239-251 p.
- BAARDSETH, P. 1978. Quality changes of Frozen vegetables. *Food Chemistry*. 3:271p.
- BARRET, DM y THEERAKULKAIT, C. 1995. Quality Indicators in Blanched Frozen, Stored Vegetable. *Food Technology*. 49(1): 62-65 p.
- BEN-AZIZ, A., GROSSMAN, S., ASCARELLI, I. y BUDOWSKI, P. 1970. Linoleate oxidation induced by Lypoxygenase and heme proteins: A direct spectrophotometric assay. *Analytical Biochemistry*. Vol 34: 88-100 p.
- BHIRUD, PR. y SOSULSKI, FW. 1993. Thermal Inactivation Kinetic of wheat germ Lipoxygenase. *Journal of Food Science*. 58(5): 1095-1098 p.

- CHANG, Y., PENNESI, A. y DICKSON, M. 1984. Characterization of Cauliflower Peroxidase Isoenzyme. *Journal Agric. Food Chem.* 32(1):18-21 p.
- CHANDIA, V. 2000. Modelo Bifásico para la determinación de los Parámetros Termocinéticos de la Desactivación de las Enzimas Peroxidasa y Lipoxigenasa en Zanahoria (*Daucus carota*), Brócoli (*brassica olerácea* cultivar itálica) sometidos a diversos tratamientos de escaldado. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 98p.
- CHEFTEL, J., CHEFTEL, H. y BESANÇON, P. 1983. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Tercera edición. Editorial Acribia. Zaragoza España. Volumen II.
- CHEU, S. y CHEN, A. 1991. Lipoxygenase as Blanching Index for Frozen Vegetable Soybeans. *Journal of Food Science.* 56(2): 448-451 p.
- CIVELLO, PM., MARTINEZ, GA., CHAVES, AR. y AÑON, MC. 1995. Peroxidase from strawberry fruti (*Fragaria ananassa Duch.*): Partial purification and determination of some properties. *Journal of Agricultural Food Chemistry.* 43(10): 2596-2601 p.
- DONNELLY, J. y ROBINSON, D. 1990. Control and use of indigenous oxidative enzymes in foods. *Food Science and Technology Today.* 4(3): 159 – 165 p.
- EDIRIWEERA, N., AKIYAMA, Y. y SAIO, K. 1987. Inactivation of Lipoxygenase in soybeans. *Journal of Food Science.* 52(3): 685 – 690 p.
- FENNEMA, O. 1980. Química de los Alimentos. 2da Edición Editorial Acribia. Zaragoza España. 417-517 p.

- GANTHAVORN, C., NAGEL, C. y POWERS, J. 1991. Thermal Inactivation of Asparagus Lipoxygenase. *Journal of Food Science*. 54(2): 371-373 p.
- GÜNES, B. y BAYINDIRH, A. 1993. Peroxidase and Lyxoxigenase Inactivation during blanching of green beans, green peas and carrots. *Lebensm-Wiss u – Technology*. 26(5): 406-410 p.
- HALPIN, B., PRESSEY, R., JEN, J y MONDY, N 1989. Purification and characterization of peroxidase isoenzyme from Green Peas (*pisum sativum*). *Journal of Food Science*. 54(3): 644-649 p.
- HEMEDA, H. y KLEIN, B. 1990. Inactivation and Regeneration of Peroxidase Activity in Vegetable Extracts Treated with Antioxidants. *Journal of Food Science* 56(1): 68-71 p.
- JIMENEZ, E. 1993. Utilización de la Enzima Lipoxigenasa y Peroxidasa como Índice en el Blanqueado de Espárragos verdes (*Asparagus officinalis L.*). Tesis para optar al título de Ingeniero en Industria Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima Perú.
- KAMPIS, A., BARTUCZ-KOVÄCS, O., HOSCHKE, A. y VÄMOS-VIGYÁZÓ 1984. Changes in peroxidase Activity of Brócoli during Processing and Frozen Storage. *Lebensm – Wiss u – Technology*. 17(5): 293-295 p.
- LING, A. y LUND, D. 1978. Determining Kinetic Parameter for Thermal Inactivation of Heat-resistant and Heat-labile isoenzymes from Thermal destruction curves. *Journal of Food Science*. 43(4): 1307-1310 p.

- MATHEIS, G. 1990. La Lipoxigenasa como enzima indicador en el blanqueado de verduras. Documentación e información Técnica Aromas. DRAGOCO. 52-59 p.
- MERSON, R., SINGH, R. y CARROAD, P. 1978. An Evaluation of Ball`Formula Method of Thermal Process Calculations. Food Technology. March 66-72 p.
- MORALES-BLANCAS, E., CHANDIA, V. y CISNEROS, L. 2002. Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase and Lipoxygenase from Brócoli, Green Asparagus and Carrots. Journal of Food Science. 67(1):146-154 p.
- MORALES-BLANCAS, E. y TORRES, J. 2003. Thermal Resistance Parameters, Determination of. Encyclopedia of Agricultural, Food and Biological Engineering. Edited by Dennis R. Heldman. 1038 – 1043 p.
- PIZZOCARO, F., AGGUJARO, R. y BERTOLO, G. 1993. Kinetics of enzymes inactivation in carrots disk during blanching. Rivista di Scidell` Alimentazione. 22(3):279-285 p.
- POWERS, JR., COSTELLO, MJ. y LEUNG, HK. 1984. Peroxidase fractions from asparagus of varying heat stabilities. Journal of Food Science. 49(6):1618-1619 p.
- RODRIGO, C., ALVARRUIZ, A., A., FRIGOLA, A. y RODRIGO, M. (1997a). Thermal Inactivation at High Temperatures and Regeneration of Green Asparagus Peroxidase. Journal Food Protection. 59(10): 1065-1071 p.
- RODRIGO, C., ALVARRUIZ, A., A., FRIGOLA, A. y RODRIGO, M. (1997b). Inactivation and Regeneration Kinetics of Horseradish Peroxidase Heated at Higt Temperatures. Journal Food Protection. 60(8): 961-966 p.

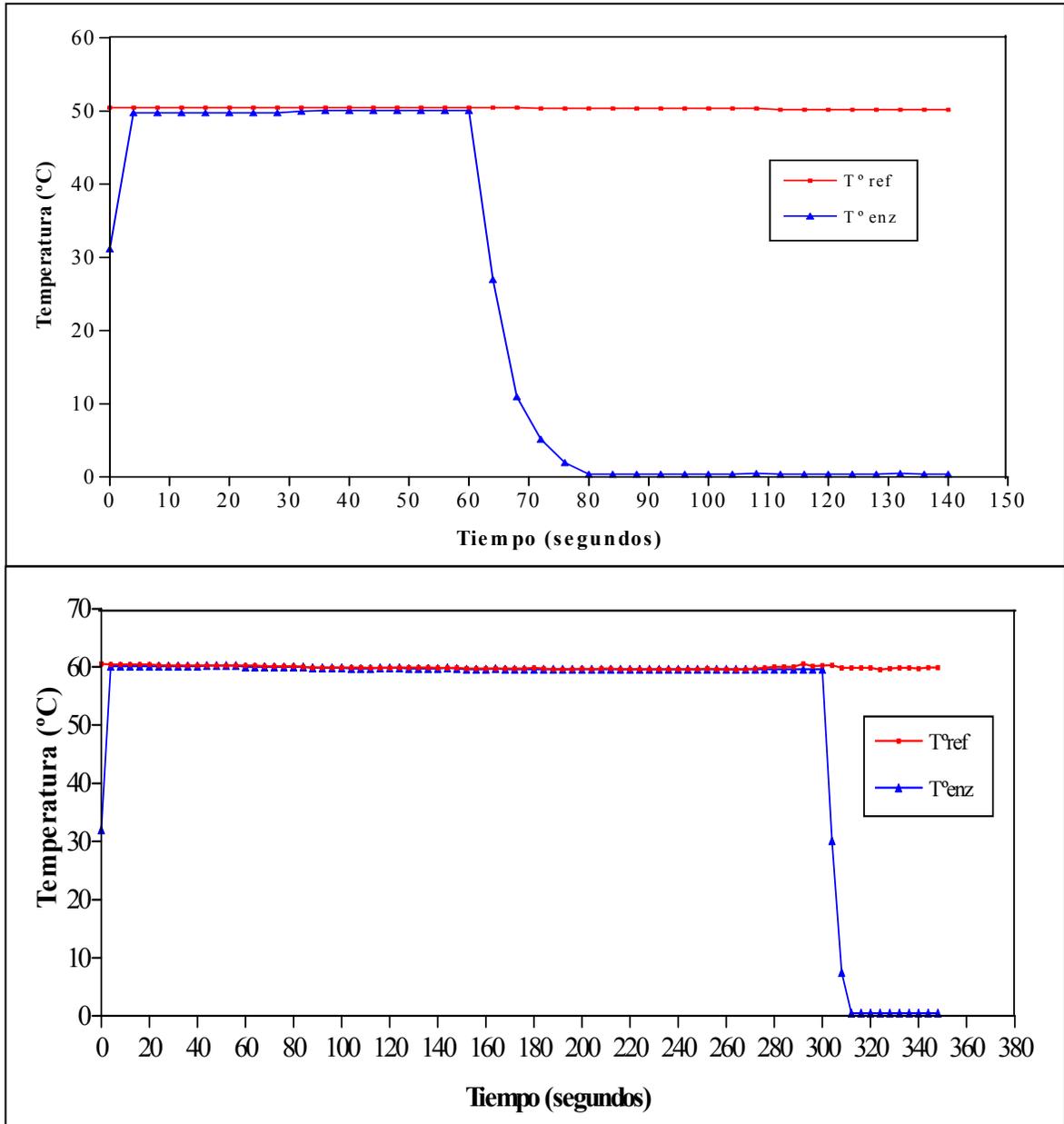
- SARAIVA, J., OLIVEIRA, J., LEMOS, A. y HENDRICKX, M. 1996. Analysis of the patterns of horseradish peroxidase thermal inactivation in sodium phosphate buffer solutions of different ionic strength. *International Journal of Food Science and Technology*. 31(3): 223-231 p.
- SARIKAYA, A. y ÖZILGEN, M. 1991. Kinetics of Peroxidase Inactivation during thermal processing of whole potatoes. *Lebensm – Wiss u – Technology*. 24(2): 159-163 p.
- SCHMIDT-HEBBEL, H. y PENNACCHIOTTI, I. 1982. Las enzimas en los alimentos. Editado por Fundación Chile. Santiago. Chile. 93p.
- SEGEL, I. 1976. Cálculos en Bioquímica. 3ra Edición Editorial Acribia. Zaragoza España. 426 p.
- SHANNON, L., KAY, E. y LEN, J. 1966. Peroxidase Isoenzymes from Horseradish. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* 241: 2166-2172 p.
- SIGMA, 1998. Biochemicals and Reagents for Life Science research. USA. p. 614 y 759. 2840 p.
- TOLEDO, R. 1991. Fundamentals of Food Process Engineering. 2da. Edición Van Nostrand Reinhold. New York USA.
- VÁMOS-VIGYÁZÓ, L. 1981. Polyphenol Oxidase and Peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Review of Food Science Nutrition*. 15(1): 49-127 p.

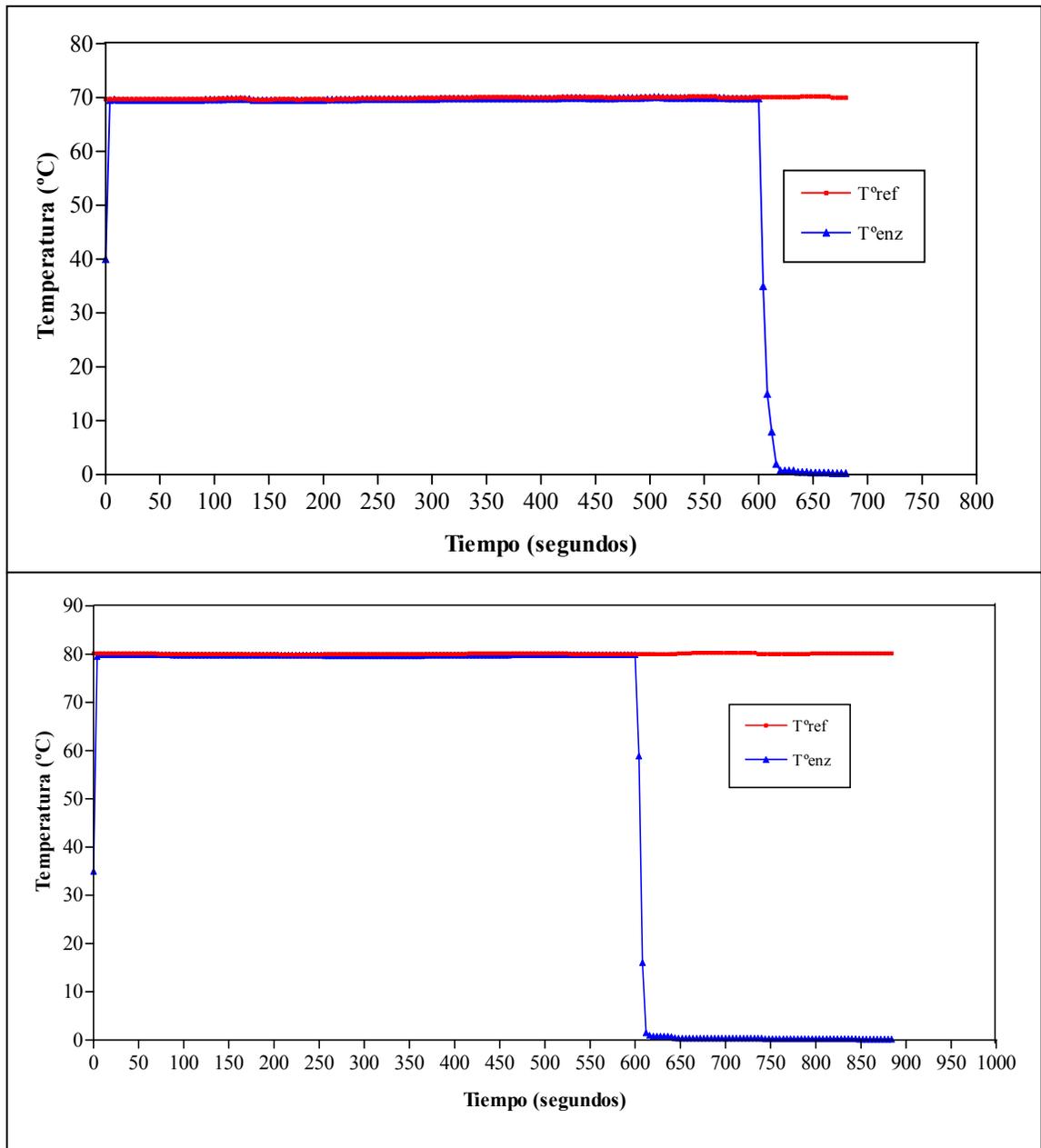
- VENEGAS, C. 1994. Evaluación del comportamiento de dos cultivares de arvejas chinas (*Pisum sativum* L.) al proceso de escaldado y congelado. Tesis para optar al título de Licenciado en Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias.
- WANG, Z. y LUH, B. 1983. Characterization of Soluble and Bound Peroxidase in Green Asparagus. *Journal of Food Science*. Vol. 48: 1412-1421 p.
- WENG, Z., HENDRICKX, M., MAESMANS, G. y TOBBACK, P. 1991. Immobilized Peroxidase: Apotencial Bioindicator for Evaluation of thermal Processes. *Journal of Food Science*. 56(2): 567-570 p.
- WHITAKER, J. 1972. Principles of enzymology for the Food Sciences. Editorial Marcel Dekker In. New York. Vol 2: 592-615 p.
- WILLIAMS, DC., LIM, MH., CHEN, AO., PANGBORN, RM. y WHITAKER, JR. 1986. Blanching of Vegetables for Freezing Which Indicator Enzyme to Choose. *Food Technology*. 40(69): 130-139 p.

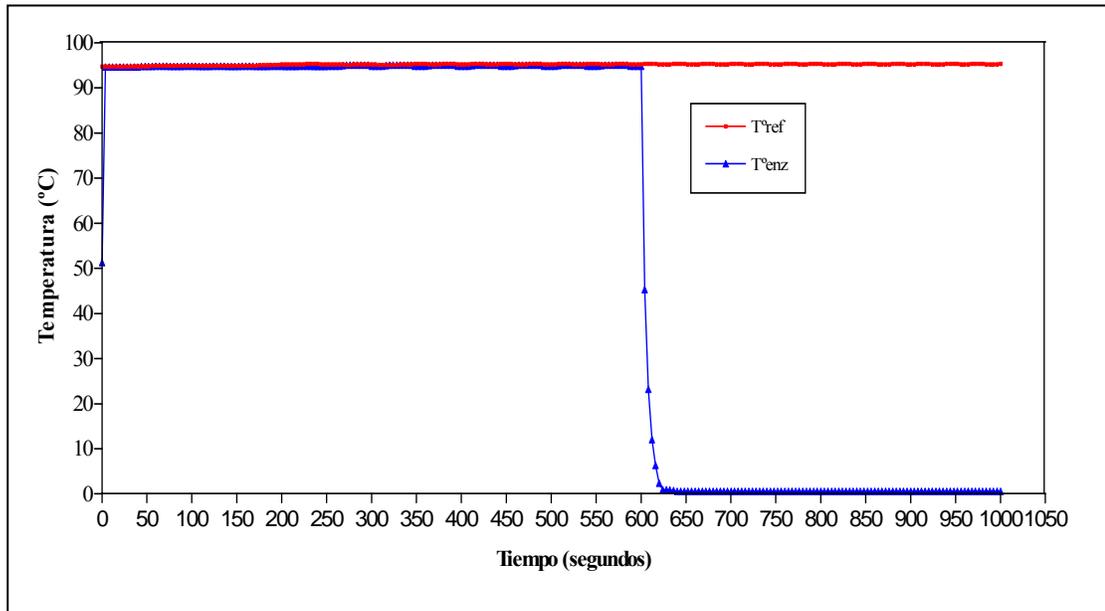
ANEXOS

ANEXO 1. Perfil de temperatura experimental del tratamiento de escaldado en las diferentes concentraciones de enzima peroxidasa a 50, 60, 70, 80 y 95 °C para 60, 300 y 600 segundos.

Enfriamiento a 0 °C.



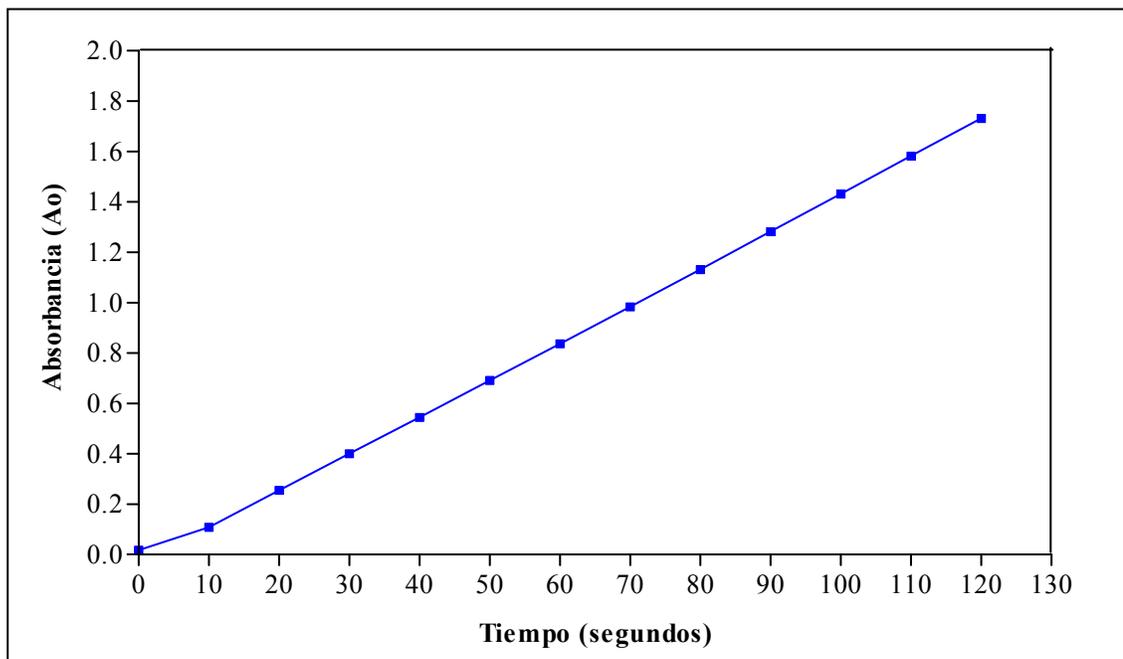
(Continuación ANEXO 1)

(Continuación ANEXO 1)

* T°ref : Es la temperatura de escaldado utilizada para el análisis.

* T°enz : Es perfil de temperatura que sigue la muestra de enzima analizada.

ANEXO 2. Determinación de la actividad residual a través del cálculo de la pendiente de la parte lineal de la gráfica de cinética de absorbancia versus el tiempo de reacción.



Este método desarrollado por RODRIGO *et al.* (1997) se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Se realiza la cinética enzimática para cada uno de los tratamientos térmicos y tiempo sin tratamientos térmicos (tiempos 0 s), a través del espectrofotómetro GENESYS 5.
- Mediante las gráficas de cinética se toma la porción recta, con la cual se obtiene la pendiente con la cual se obtiene el valor de la actividad residual.
- De la gráfica anterior por ejemplo que corresponde a la concentración 1Unidad/ml de enzima peroxidasa comercial y al tiempo sin tratamiento térmico se procedió para obtener el valor de actividad residual realizando el siguiente cálculo.

- El valor del rango de Absorbancia absoluto fue dividido por el rango de tiempo tomado para la porción recta analizada.

- Los valores de absorbancia fueron 0,256 y 0,985 para los tiempos de cinética de 20 y 70 s respectivamente, con lo cual se obtiene el resultado para la pendiente

$$m = \frac{(0,985 - 0,256)}{(70 - 20)} = 0,01486$$

- El resultado representa el $(U_t/U_0) \times 100$ en esta concentración que es el tiempo sin

tratamiento térmico y cual corresponde al $\frac{0,01486}{0,01486} = 1$ y que es el 100%. Además este

valor se usara para todos los otros valores obtenidos en las cinéticas con tratamiento térmico, lo que permitirá ir calculando las distintas actividades residuales mostradas en las tablas de resultados en cada uno de los tiempos con tratamiento térmico en esta concentración y en las demás.

ANEXO 3. Determinación de contenido en mg proteína/mL de enzima, actividad en U_o/mL y actividad en U_o/mg proteína.

- Determinación de contenido en mg de proteína/mL.
- Para este cálculo se utilizó la actividad específica que corresponde a 250 Unidad/mg proteína de enzima y se relacionó con las concentraciones analizadas, obteniendo por medio de una proporción directa el contenido de proteínas para las cuatro muestras estudiadas relacionado a 1 mL. Por ejemplo para la concentración 10 Unidad/mL se tiene:

$$\begin{array}{l|l} 250\text{Unidad} \longrightarrow & \text{mg de proteína} \\ 10\text{Unidad} \longrightarrow & x \text{ mg de proteína} \end{array} \quad \mathbf{x = 0,04 \text{ mg de proteína/mL}}$$

- Determinación de actividad de peroxidasa en U_o/mL.
- Para obtener este resultado se realiza una proporción directa con el valor de Absorbancia/min para el tiempo sin tratamiento térmico (tiempo 0 s), obtenido para las muestras de solución enzimática analizada que fue de 0,12 mL. Esto se relaciona a 1 mL de solución enzimática. Por ejemplo para la concentración 10 Unidad/mL se tiene:

$$\begin{array}{l|l} 0,05101\text{U}_o \longrightarrow & 0,12 \text{ mL} \\ x \text{ U}_o \longrightarrow & 1 \text{ mL} \end{array} \quad \mathbf{x = 0,42508 \text{ U}_o/\text{mL}}$$

- Determinación de actividad de peroxidasa en U_o/mg proteína.
- Una vez obtenido el valor de U_o/mL, nuevamente se hace una proporción directa con el valor de mg proteína/mL. Entonces se tiene para la concentración 10 Unidad/mL:

$$\begin{array}{l|l} 0,42508\text{U}_o/\text{mL} \longrightarrow & 0,04\text{mg proteína/mL} \\ x \text{ U}_o/\text{mL} \longrightarrow & 1 \text{ mL} \end{array} \quad \mathbf{x = 10,627 \text{ mg proteína/mL}}$$

ANEXO 4. Actividad de la enzima peroxidasa de concentración 10 Unidad/mL para los diferentes tratamientos térmicos.

Tiempo (s)	Temperatura (°C)				
	50	60	70	80	95
0	0,051 ± 0.001	0,051 ± 0,001	0,051 ± 0,001	0,051 ± 0,001	0,051 ± 0,001
15	0,048 ± 0.001	0,048 ± 0,001	0,046 ± 0,002	0,045 ± 0,02	0,027 ± 0,002
30	0,045 ± 0.002	0,044 ± 0,001	0,043 ± 0,001	0,041 ± 0,01	0,022 ± 0,001
45	0,037 ± 0.003	0,037 ± 0,001	0,036 ± 0,002	0,033 ± 0,02	0,013 ± 0,002
60	0,036 ± 0.0057	0,036 ± 0,001	0,034 ± 0,003	0,029 ± 0,01	0,009 ± 0,001
180	0,035 ± 0.0057	0,032 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,028 ± 0,01	0,008 ± 0,001
300	0,034 ± 0.0057	0,032 ± 0,002	0,027 ± 0,002	0,022 ± 0,03	0,007 ± 0,001
600	0,033 ± 0,0102	0,031 ± 0,005	0,022 ± 0,001	0,022 ± 0,001	0,006 ± 0,002
1500	0,032 ± 0.0057	0,030 ± 0,008	0,019 ± 0,001	0,017 ± 0,002	0,003 ± 0,001

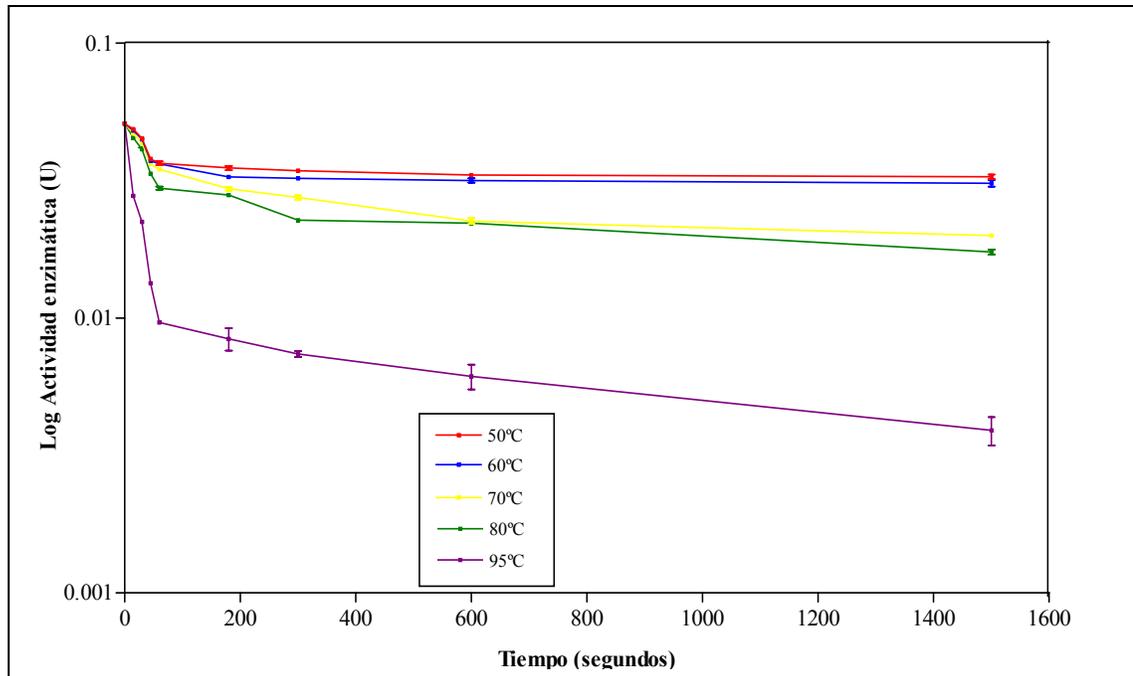
ANEXO 5. Actividad de la enzima peroxidasa de concentración 1 Unidad/mL para los diferentes tratamientos térmicos.

Tiempo (s)	Temperatura (°C)				
	50	60	70	80	95
0	0,014 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,014 ± 0,001	0,014 ± 0,001
15	0,013 ± 0,002	0,012 ± 0,001	0,011 ± 0,002	0,011 ± 0,001	0,006 ± 0,003
30	0,012 ± 0,003	0,011 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,010 ± 0,003	0,006 ± 0,001
45	0,011 ± 0,001	0,010 ± 0,002	0,010 ± 0,002	0,010 ± 0,002	0,005 ± 0,002
60	0,010 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,003	0,004 ± 0,001
180	0,010 ± 0,003	0,010 ± 0,002	0,009 ± 0,003	0,009 ± 0,001	0,003 ± 0,001
300	0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,003	0,008 ± 0,001	0,006 ± 0,003	0,003 ± 0,002
600	0,009 ± 0,002	0,009 ± 0,001	0,007 ± 0,002	0,005 ± 0,002	0,003 ± 0,001
1500	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,002 ± 0,004

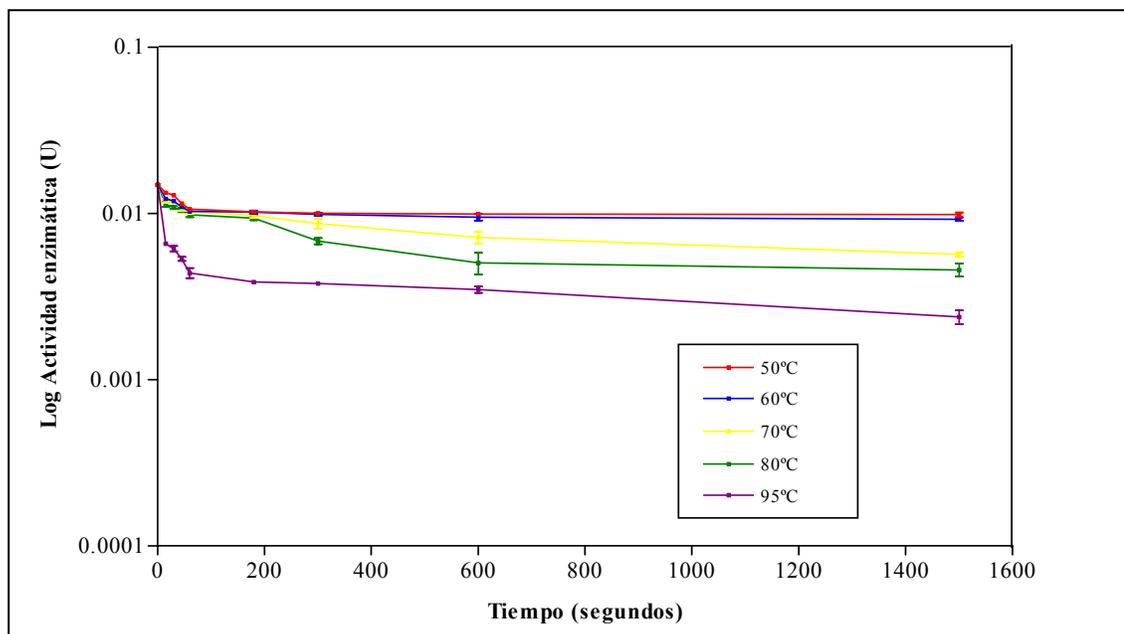
ANEXO 6. Actividad de la enzima peroxidasa de concentración 0,1 Unidad/mL para los diferentes tratamientos térmicos.

Tiempo (s)	Temperatura (°C)				
	50	60	70	80	95
0	0,001± 0,0001	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001
15	0,0006 ± 0,0001	0,00061 ± 0,00030	0,00054 ± 0,00003	0,00033 ± 0,00300	0,00026 ± 0,00100
30	0,0005 ± 0,0001	0,00054 ± 0,00010	0,00052 ± 0,00001	0,00026 ± 0,00100	0,00013 ± 0,00100
45	0,0005 ± 0,0002	0,00051 ± 0,00010	0,0005 ± 0,00001	0,00025 ± 0,00200	0
60	0,0005 ± 0,0003	0,00050 ± 0,00010	0,0005 ± 0,0002	0,0002 ± 0,0030	0
180	0,0005 ± 0,0001	0,00050 ± 0,00020	0,0003 ± 0,0001	0,0002 ± 0,0010	0
300	0,0005 ± 0,0001	0,00049 ± 0,00020	0,0003 ± 0,0003	0,00011 ± 0,00100	0
600	0,0004 ± 0,0002	0,00049 ± 0,00010	0,0002 ± 0,0001	0	0
1500	0,0004 ± 0,0001	0,00047 ± 0,00030	0,00011 ± 0,00001	0	0

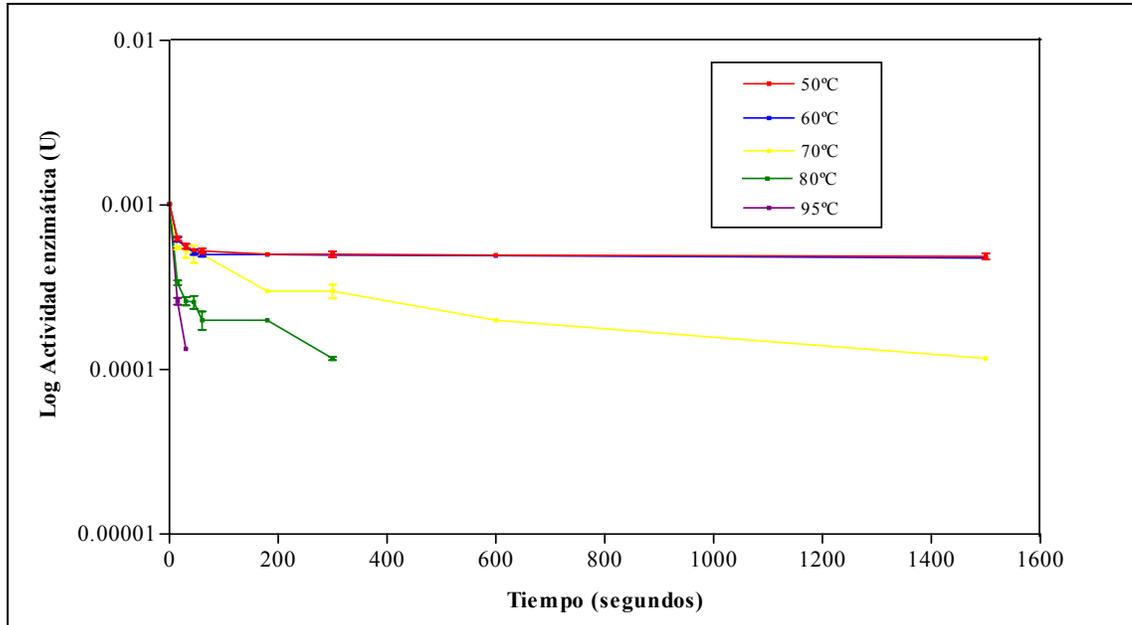
ANEXO 7. Curva de actividad enzimática semilogarítmica de (U) para concentración 10 Unidad/mL.



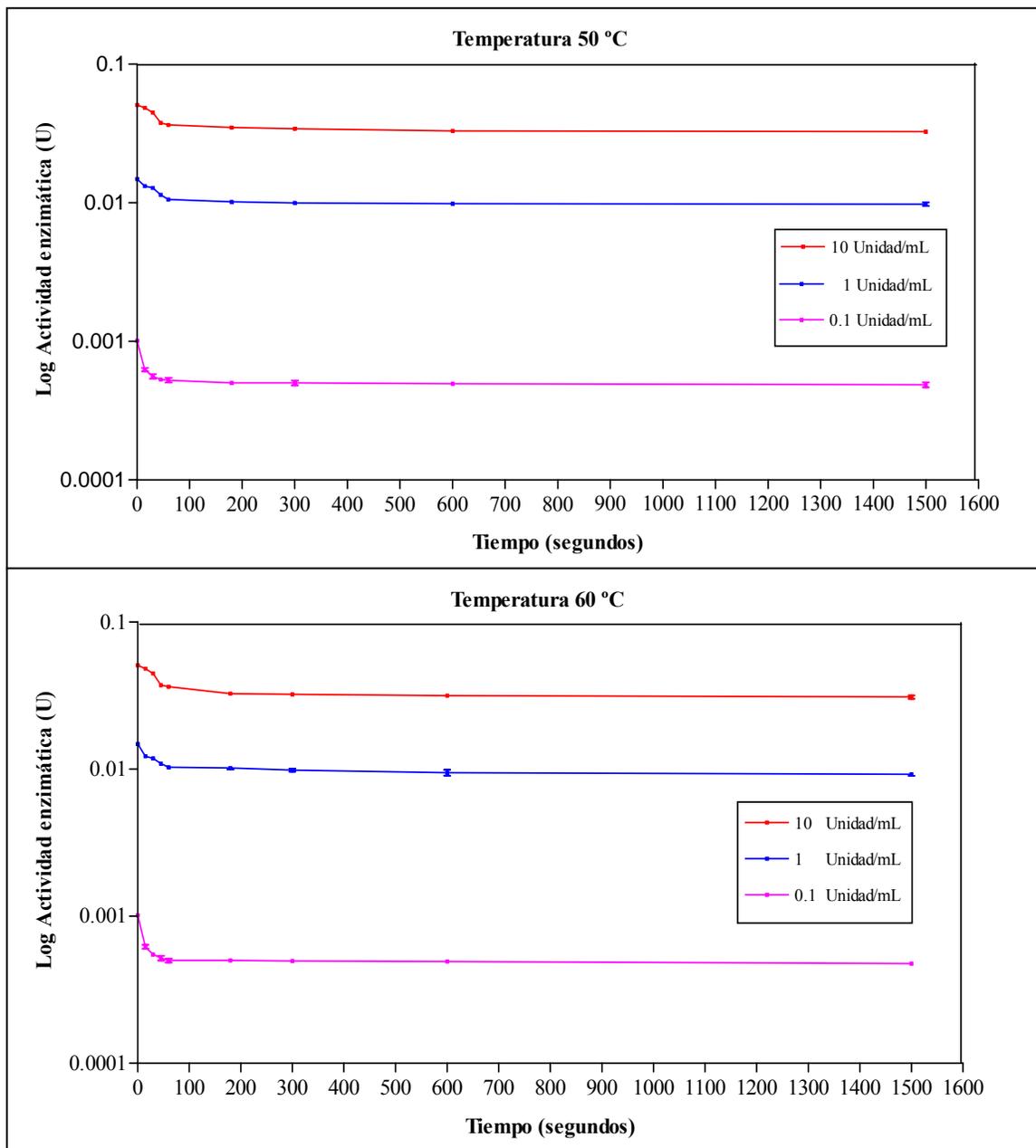
ANEXO 8. Curva de actividad enzimática semilogarítmica de (U) para concentración 1 Unidad/mL.



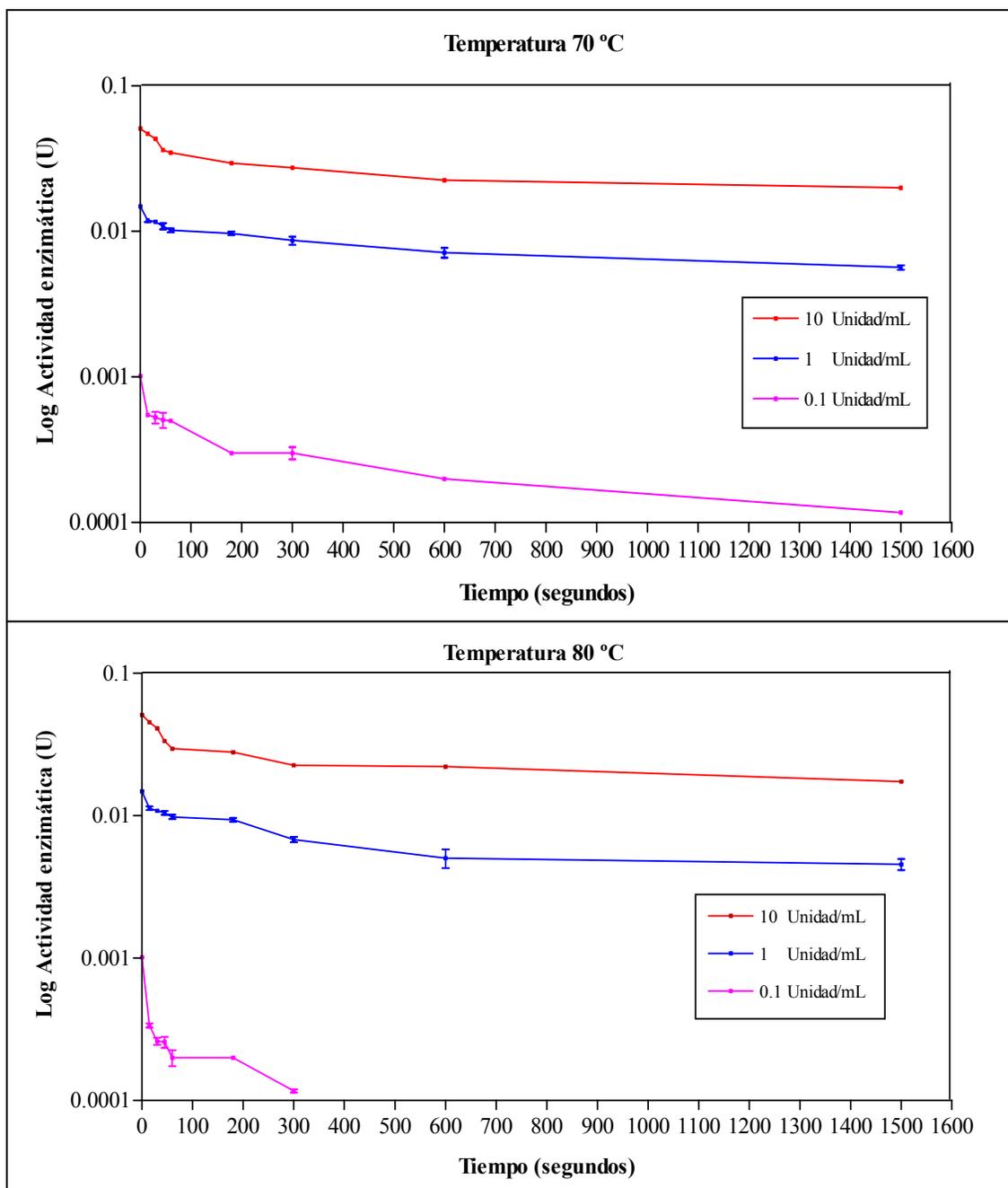
ANEXO 9. Curva de actividad enzimática semilogarítmica de (U) para concentración 0,1 Unidad/mL.

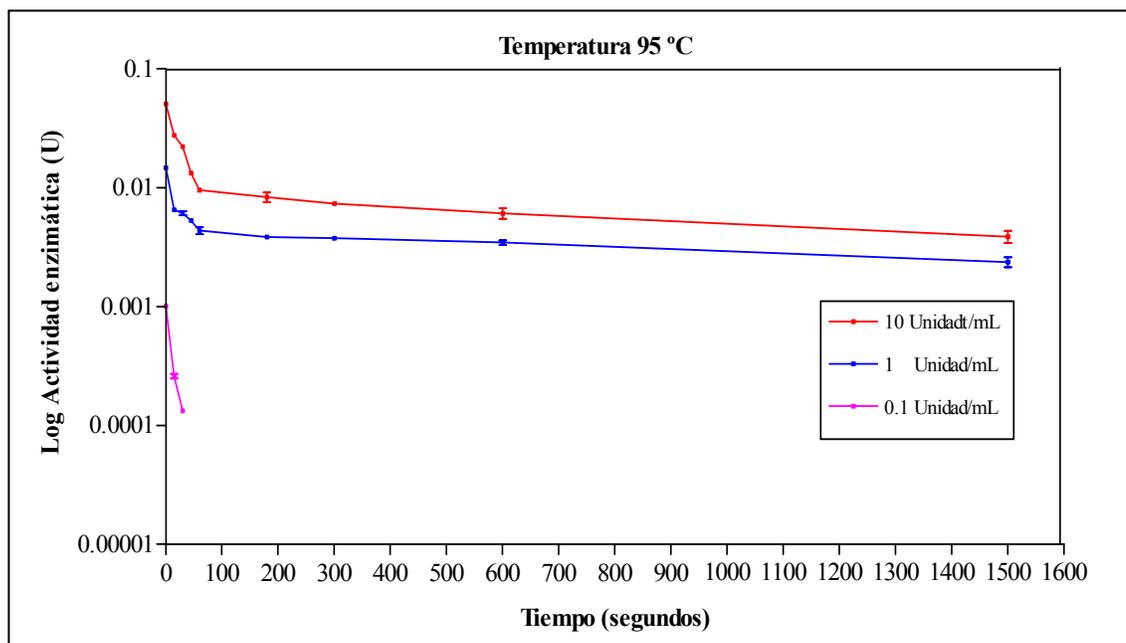


ANEXO 10. Curvas semilogarítmicas de actividad enzimática en (U) para concentración 10, 1 y 0,1 Unidad/mL para temperaturas de 50, 60, 70, 80 y 95 °C respectivamente.



(Continuación ANEXO 10)



(Continuación ANEXO 10)

ANEXO 11. Determinación de parámetros k_L y k_R de inactivación termocinética.

- Para este cálculo se utilizó el método de LING y LUND (1978) mediante las ecuaciones 2.11 y 2.12, que corresponde a una regresión lineal ($y = a + bx$) de los tiempos y el logaritmo del porcentaje de actividad residual que se utiliza para la determinación de la fracción termorresistente, obteniendo los valores del intercepto y de la pendiente de la recta. El valor del intercepto encontrado en la fracción termorresistente es utilizado para obtener la fracción termolábil.
- Determinación fracción termorresistente (k_R)
 - Los intervalos de tiempos utilizados para esta regresión lineal tomaron valores entre 60 y 180 s hasta 150 s, para obtener esta fracción.
 - El resultado de la pendiente corresponde dentro de la ecuación a $-\frac{k_R}{2,303} = b$. Por ejemplo para la concentración 1 Unidad/mL y temperatura de 50°C se obtuvo una pendiente de $-1,029520207 \times 10^{-5}$ lo que al ser reemplazado da como resultado $k_R = 1,029520207 \times 10^{-5} \times 2,303 = 0,237 \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$.
 - Para obtener el intercepto se utiliza el valor de $a = 1,834013247$ que es el $\log(U)$, por lo cual se necesita elevar a la base 10^a lo cual da el valor del intercepto de la recta analizada en la regresión. Para la concentración anterior se tiene un intercepto de $10^{1,834013247} = 68,23595074$, que correspondería al porcentaje de actividad para esta regresión.
- Determinación fracción termolábil (k_L)
 - Los intervalos de tiempos utilizados para esta regresión lineal tomaron valores entre 0 s hasta 45 y 60 s, para obtener esta fracción.
 - El resultado de la pendiente corresponde dentro de la ecuación a $-\frac{k_L}{2,303} = b$. Por ejemplo para la concentración 1 Unidad/mL y temperatura de 50°C se obtuvo una

pendiente de $1.029520207 \times 10^{-5}$ lo que al ser reemplazado da como resultado $k_L = -1,598465596 \times 10^{-2} \times 2,303 = 368,1 \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$.

- Para la determinación de los parámetros k_R y k_L mediante la regresión lineal se utilizó como instrumento de calculo la calculadora CASIO FX-880P personal computer y planilla de cálculo excel microsoft.

ANEXO 12. Cálculo de energía de activación (Ea) para la fracción termorresistente y termolábil de las diferentes concentraciones de enzima peroxidasa comercial desde un rango de 70 a 95 °C.

- Para el calculo Energías de activación se utilizo la ecuación 2.4 la cual fue linealizada para obtener mediante una regresión lineal Ea de la fracciones termorresistente y termolábil.
- Para Ea de la fracción termorresistente y termolábil se ocupo la ecuación $\ln k_L = \ln k_{OL} - \frac{Ea_L}{R} \cdot \frac{1}{T}$ y $\ln k_R = \ln k_{OR} - \frac{Ea_R}{R} \cdot \frac{1}{T}$ respectivamente, donde $(-\frac{Ea_L}{R} = b)$ corresponde a la pendiente que será encontrada a través de la regresión líneal . Además $(k_L$ y $k_R)$ son las fracciones respectivas, donde k_{OL} y k_{OR} son las constantes de Arrhenius, R es la constante universal de gases (8,31 J/mol K) y T es la temperatura absoluta en (K).
- Determinación Energía de activación fracción termolábil y termorresistente
- Como ejemplo de cálculo para la fracción termorresistente y termolábil en un rango de temperatura de 70 a 95°C sé vera el resultado para 10 Unidad/mL, donde se obtiene una pendiente $b = - 0,3575 \times 10^4$ con lo cual se obtiene $Ea_R = 2,971 \times 10^4$ (J/mol) y una pendiente $b = 0,477 \times 10^4$ con la cual se obtiene $Ea_L = 3,966 \times 10^4$ (J/mol) respectivamente.